

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

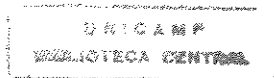
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
ENGENHARIA DE PROCESSOS**

ESTUDO DA CALCIFICAÇÃO "IN VITRO" DE QUITOSANA

**Autor : Marisa Masumi Beppu
Orientador: Cesar C. Santana**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Campinas - São Paulo
Dezembro de 1999



UNIDADE	B.C.
N.º CHAMADA	T/UNICAMP
	B45e
V.	Ex.
TOMBO BIC	40850
PROC.	278700
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	\$11,00
DATA	04/04/00
N.º CPD	

CM-00137651-B

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

B45e Beppu, Marisa Masumi
Estudo da calcificação *in vitro* de quitosana / Marisa
Masumi Beppu--Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Cesar Costapinto Santana
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.


1. Quitosana. 2. Calcificação. 3. Fosfato de cálcio. I.
Santana, Cesar Costapinto. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Folha de aprovação

Tese de Doutorado defendida por Marisa Masumi Beppu e aprovada em 03 de dezembro de 1999 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Cesar C. Santana - Orientador



Prof. Dr. Mauro C. M. Laranjeira



Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran




Profa. Dra. Cecília A. C. Zavaglia




Prof. Dr. Gustavo Paim Valença

Este exemplar corresponde à redação final da tese de doutorado em Engenharia Química defendida por Marisa Masumi Beppu e aprovada pela comissão julgadora em 03/12/1999.



Prof. Dr. Cesar C. Santana



ATENÇÃO:

O conteúdo e os principais resultados desta tese estarão protegidos por patente depositada no INPI.

Dedico este trabalho àqueles que acreditam na ética e no valor do trabalho científico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me acompanharam nesse trabalho:

- ✓ Marcos, que sempre acreditou em mim;
- ✓ Meus pais, que mesmo longe sempre torcem por mim;
- ✓ Meus fiéis amigos de laboratório, "três mosqueteiros": Eduardo, Fábio e Zé Antônio;
- ✓ Demais colegas que tornaram a vida em laboratório um processo de contribuição mútua: Sérgio, Denise, Adriano, Líbia, Eucimar, Rosana, Sandra, Susana, Vinícius e tantos outros;
- ✓ Prof. Cesar C. Santana que deu-me toda a liberdade e autonomia para conduzir este trabalho no qual acreditei desde o princípio;
- ✓ Professores e profissionais que não hesitaram em momento algum em prover-me ricas discussões, seus laboratórios e equipamentos: Técnica Rita (DEMA, imagens de MEV), Profa. Lúcia Wada e seu aluno Arnaldo (biologia celular), Prof^a. Íris Torriani e Carlos (medidas de difração de RX); Prof. Gustavo Paim Valença e seu aluno Emerson (medidas de difração de RX); Prof. Celso Arruda, Prof^a. Cecília Zavaglia e Prof^a Sônia Malmonge (Labiomec); Prof. F. Galembeck (discussões a respeito da calcificação); Prof^a Mônica - IFGW (MFA), Prof. Rodnei e seu aluno Marcos Lanza (análises de cálcio);
- ✓ O CNPq e PRONEX pelo financiamento deste trabalho;
- ✓ A UNICAMP que me deu todas as condições para formar-me como profissional e como pessoa;
- ✓ O Brasil, ao qual espero retribuir e dedicar meu trabalho futuro, que nos dá a estrutura para estudarmos numa universidade pública.

*"Nunca ande pelo caminho traçado,
pois ele conduz somente até onde os
outros já foram"*

Alexander Graham Bell (1847-1922)

RESUMO

A quitosana tem despontado nos últimos anos como um biomaterial de grande potencialidade para aplicação em vários campos, passando por medicina, biotecnologia, alimentos, etc. Entretanto, uma face ainda pouco explorada é o comportamento desse biomaterial quando em contato com fluidos corpóreos.

Este trabalho objetiva a obtenção de membranas densas e porosas de quitosana de casca de caranguejo, sua modificação através de reação com glutaraldeído e poli(ácido acrílico)-PAA, e a calcificação promovida sobre esses substratos.

Utilizou-se, para tanto, experimentos *in vitro*, com duração de 7 dias a 1 mês, no qual se mergulhavam os substratos (modificados ou não) em soluções que simulam as concentrações de sais observadas em fluidos corpóreos reais. Estudou-se influências de fatores como: pH, composição do meio calcificante e características físicas (permeabilidade, porosidade) e químicas do substrato de quitosana; sobre o tipo de calcificação observado. A análise dos substratos de quitosana com ou sem calcificação foi realizada através de técnicas como microscopia (eletrônica de varredura e força atômica), espectroscopia (EDS, FTIR-ATR) e análises químicas (elementar de P e Ca) e estruturais (difratometria de RX e adsorções).

Observou-se que calcificação dependia: 1) do tratamento ao qual a quitosana era submetida: a deposição em grande extensão era obtida em amostras tratadas com PAA, principalmente devido aos grupos carboxílicos que adsorvem muito bem os íons cálcio. Efeito inverso foi observado nas amostras reticuladas com glutaraldeído que tendem a aumentar as porções hidrofóbicas da matriz de quitosana, que pouco induzem a calcificação; 2) da composição e pH do meio calcificante: em níveis altos de íon fosfato ou íon cálcio, os depósitos formados mostram composição e estrutura diferentes; 3) a porosidade das membranas propiciam uma maior deposição de sais de cálcio.

Os resultados indicam que o mecanismo de calcificação *in vitro* de quitosana passa por um processo misto de ancoragem mecânica e de afinidade química (no caso, com preponderância de interações iônicas) dos grupos na superfície do substrato.

Pode-se concluir que é possível se promover de maneira relativamente controlada, a calcificação sobre a quitosana e também que o resultado desse processo pode servir, com maiores adaptações, em aplicações diversas (como por exemplo, na adsorção de proteínas).

Palavras-chave: Quitosana, calcificação, biomineralização, fosfato de cálcio.

ABSTRACT

Chitosan is recently being appointed as a biomaterial with significant potential to use in many fields, such as medical science, biotechnology, food science, etc. However, the behavior when chitosan is contacted with body fluids, is still not completely understood.

The present work aims to study: the production of dense and porous chitosan (from crab shells) membranes; their chemical modification (by reaction with glutaraldehyde or addition of poly(acrylic acid)-PAA); and their calcification.

In order to do that, *in vitro* experiments were done: the substrates were soaked in a solution which simulated the salt concentration of body fluids (plasma) from 7 days to 1 month. Effects of pH, calcifying medium composition and physical (porosity, permeability) and chemical characteristics of substrates on calcification quality and degree were observed. Samples were analyzed through microscopy (scanning electron microscopy and atomic force microscopy), spectroscopy (EDS and FTIR-ATR) and chemical (P and Ca) and structural (X-ray diffraction and adsorption) analyses.

It was observed that calcification depended on: 1) treatment under which chitosan was submitted: expressive deposition was obtained in samples treated with PAA, mainly due to carboxil groups that adsorb calcium ion. The opposite was observed in samples fixed with glutaraldehyde, which tends to increase the hydrophobicity of matrix, inducing less calcification; 2) composition and pH of calcifying fluid: at high levels of Ca or P, the deposits showed different compositions; 3) porosity of membranes that induce better deposition.

Results indicate that *in vitro* calcification mechanism is composed by both mechanical anchoring of ions and chemical affinity (mainly with ionic interaction) of groups on substrate surface.

We can conclude that calcification on chitosan may be promoted in a fairly controlled way and its product may also be useful with further adaptations for many applications (such as liquid chromatography).

Key words: Chitosan, calcification, biomineralization, calcium phosphate.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Objetivos	4
3. Revisão da literatura	5
3.1- Biomateriais	5
3.2- Calcificação de biomateriais	5
3.3- Modelos experimentais de calcificação	7
3.4- Quitosana	7
3.5- Compostos de cálcio	14
3.6- Adsorção de proteínas	14
4. Materiais e métodos	18
4.1- Síntese de membranas de quitosana	18
4.2- Reticulação das membranas de quitosana com glutaraldeído	24
4.3- Tratamento das membranas de quitosana com poli(ácido acrílico)-PAA	29
4.4- Ensaio de calcificação de quitosana <i>in vitro</i>	31
4.5- Ensaio de adsorção de proteína em quitosana calcificada	40
5. Resultados e discussão	42
5.1- Síntese de membranas de quitosana	42
5.2- Reticulação das membranas de quitosana com glutaraldeído	49
5.3- Tratamento das membranas de quitosana com poli(ácido acrílico)-PAA	62
5.4- Ensaio de calcificação de quitosana <i>in vitro</i>	67
5.5- Ensaio de adsorção de proteína em quitosana calcificada	97
6. Discussão geral	106
7. Conclusões	117
8. Sugestões para próximos trabalhos	118
9. Referências bibliográficas	119

NOMENCLATURA E SIGLAS

ACP- fosfato de cálcio amorfo

ATG - análise termogravimétrica (TGA em inglês)

ATR- refletância total atenuada ("attenuated total reflectance")

β - constante da célula (experimentos de difusão)

BSA- albumina de soro bovino

D- coeficiente de difusão

EDS- espectroscopia de raios-X por dispersão de energia

FCS - fluido corpóreo simulado

FDA- Food and drug administration (EUA)

FTIR- fourier transform infra-red

HA- hidroxiapatita

IV - infra-vermelho

M - unidade de concentração molar (mol/l)

MEV- microscopia eletrônica de varredura

MFA- microscopia de força atômica

OCP - fosfato de octacálcio

PAA- poli(ácido acrílico)

PM -peso molecular

RMN- ressonância magnética nuclear

RX- raios-X

UV- ultra-violeta

[]- simbologia para concentração

1. INTRODUÇÃO

A biomineralização é um fenômeno de grande interesse para várias áreas científicas e tecnológicas, por diferentes razões. Na área de materiais, pode permitir a formação de compósitos mais resistentes e funcionais. Na medicina, permite o melhor entendimento do processo natural de formação de ossos e dentes para o desenvolvimento de implantes osteogênicos e próteses de correção ortopédica. Além disso, o conhecimento dos processos de biomineralização podem evitar a calcificação patológica e o fracasso de muitos implantes e aparelhos médicos (principalmente do sistema cardiovascular) devido, na maioria das vezes, à calcificação.

A calcificação limita a durabilidade de próteses poliméricas como válvulas cardíacas, implantes mamários, órgãos artificiais, lentes de contato e de bombas para circulação sanguínea. A calcificação pode ser desejável ou não, dependendo da aplicação do biomaterial. Cabe, para a formulação e produção de implantes, saber controlar a ocorrência ou não da calcificação, o que requer um completo entendimento desse fenômeno.

Compósitos polímero-cerâmica produzidos naturalmente por organismos são conhecidos por apresentarem propriedades muito interessantes, se comparados com aqueles dos materiais obtidos tecnologicamente. Exemplos ilustrativos são conchas de moluscos, reconhecidamente rígidas, sendo porém estruturas formadas por ingredientes estruturalmente fracos como o carbonato de cálcio e a quitina. O nácar é outro caso, onde carbonato de cálcio compõe cerca de 95% em volume, sendo o restante proteína e quitina: sua fase inorgânica consiste em aragonita muito bem orientada que proporciona propriedades mecânicas singulares. Apesar do alto conteúdo de fase inorgânica, o nácar possui excelente resistência à fratura. Ossos consistem em outro tipo de compósito constituído de colágeno e hidroxiapatita (fase mineral). A mineralização dos ossos é um processo complexo controlado por muitos fatores. Inicialmente, fosfato de cálcio é depositado nos vazios entre as fibras de colágeno e então, é depositado em poros maiores. Os cristais que se formam são placas de nanômetros de espessura e dezenas de nanômetros de largura e altura.

A deposição *in situ* (biomineralização) como processo de síntese oferece vantagens: evita dificuldades como a de se lidar com a agregação de partículas nanométricas, dispensando-se o uso de grande quantidade de tensoativos para mantê-las em suspensão. Isto é possível pois os precipitados inorgânicos formam-se com total controle de uma matriz sobre a forma, o tamanho e a orientação dos depósitos.

Em vez de replicar o processo de biomineralização por inteiro, os cientistas normalmente dividem o processo em estágios que podem ser entendidos e adaptados para rotas práticas de processo. Cristalização de hidroxiapatita a partir de soluções aquosas tem sido estudada por vários autores (Gaillard e Van Blitterswijk, 1994; Calvert e Rieke, 1996; Li et alli, 1997), assim como a influência da adição de vários polieletrólitos e peptídios na cristalização de sais de cálcio "inorgânicos" (Zhang e Gonsalves, 1997; Martin e Brown, 1994). A maioria desses estudos foram conduzidos para se entender os fatores que controlam a nucleação e a orientação da cristalização; entretanto, o conhecimento sobre as interfaces polímero-cerâmica, estrutura, química e se a interação interfacial envolve ou não íons, ainda não é completo.

O mecanismo de biomineralização tem sido descrito para várias cerâmicas de fosfato de alumínio, vidros e vitro-cerâmicos, além de certos elastômeros como o copolímero Polyactive®. A grande maioria desses estudos consiste em constatações retiradas da prática de uso destes materiais como implantes e compósitos obtidos a partir da mistura de fases mineral e orgânica pré-fabricadas.

A quitosana é particularmente interessante para aplicações como biomaterial devido à sua compatibilidade com organismos vivos. Além disso, economicamente, é muito interessante por ser derivada do segundo biomaterial mais abundante na natureza, a quitina.

Atualmente, a quitosana é extraída em larga escala como um subproduto da indústria marinha, a partir do exoesqueleto de crustáceos, como o caranguejo e camarão.

No entanto, apesar de toda a sua potencialidade, o uso da quitosana como biomaterial pouco tem sido explorado. Seu maior uso até poucos anos era como agente flocculante para tratamento de águas no Japão. Atualmente, a quitosana tem surgido como alternativa alimentar.

A quitosana pode ser um substrato interessante para se promover calcificação e constituir compósitos devido à sua natureza poli-iônica. Entretanto, a sua utilização com a finalidade de promover calcificação ainda é muito rara e pouco se sabe dos mecanismos e fenômenos associados (Muzzareli et alli, 1994; Furlan et alli, 1996).

Procurando avaliar a possibilidade do seu uso em processos de calcificação, sintetizamos substratos a partir de quitosana extraída de casca de caranguejo. Tais substratos têm a forma e as características de superfície modificadas, o que permite um estudo sistemático do processo de calcificação *in vitro* da quitosana. Dessa forma, podemos correlacionar características físicas de sua matriz tais como sua permeabilidade e porosidade, e químicas como a predominância de diferentes grupos em sua superfície, com as características morfológicas e químicas dos minerais formados.

O "estudo da calcificação *in vitro* de quitosana" é fruto da integração das experiências do presente laboratório com o uso de quitosana para uso em biotecnologia (explorando a potencialidade da quitosana como substrato e resina de cromatografia) e da autora (com experiência em trabalhos com fosfatos inorgânicos), buscando estudar a potencialidade do sistema quitosana-fosfato de cálcio como biomaterial.

Os resultados obtidos neste trabalho acrescentam informações tanto do ponto de vista de processos de calcificação em geral, como do ponto de vista específico do uso da quitosana como biomaterial a ser calcificado ou utilizado em biotecnologia.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho consistem em:

- 1) preparar e caracterizar membranas (substratos) de quitosana natural;
- 2) modificar, de maneira sistematizada, a natureza físico-química dessas membranas;
- 3) estudar a calcificação desses substratos através de experimentos *in vitro*. Este estudo engloba a verificação da influência, na formação de depósitos de cálcio quanto à intensidade e tipo de fase mineral formada, de fatores como:
 - pH e composição do meio calcificante;
 - caráter químico da quitosana (com mais ou menos grupos polares e carga de superfície);
 - caráter físico da quitosana (porosidade, permeabilidade);
- 4) caracterizar as calcificações ocorridas;
- 5) estabelecer um modelo de calcificação para a quitosana.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Este capítulo descreve os conceitos básicos envolvidos neste trabalho e as informações correlatas descritas na literatura, tais como: biomateriais e sua calcificação, modelos experimentais de calcificação, quitosana, adsorção e compostos de cálcio.

3.1. Biomateriais

Biomaterial é definido como qualquer substância ou combinação destas que não sejam drogas ou fármacos, de origem natural ou sintética, que pode ser usado por tempo indeterminado, aumentando ou substituindo parcial ou totalmente qualquer órgão, tecido ou função do corpo, sem desencadear reações desfavoráveis, imprevisíveis ou incontroláveis (Codaro e Guastaldi, 1998; Willians, 1986).

Os biomateriais podem ser bio-inertes, bio-ativos ou bio-absorvíveis e o avanço nessa área depende do desenvolvimento de vários ramos do conhecimento, devido à multidisciplinaridade do tema.

3.2. Calcificação de Biomateriais

O fracasso de muitos implantes e aparelhos médicos (principalmente do sistema cardiovascular) deve-se, na maioria das vezes, à calcificação. Entende-se como **calcificação** ou mineralização a formação de depósitos de fosfato ou outros compostos de cálcio.

Apesar da deposição de sais minerais ocorrer como um processo normal em ossos e dentes, para determinados biomateriais utilizados na área médica esse fenômeno é completamente indesejável podendo influir na sua funcionalidade. Mesmo em órgãos humanos, como os rins, por determinadas condições, ocasionalmente ocorrem calcificações anormais e patológicas. Tais processos de mineralização patológicas podem ser classificadas em (Pathak et alli, 1996):

- **Calcificação distrófica** é aquela que ocorre em biomateriais ou tecidos danificados ou doentes, em indivíduos com metabolismo de cálcio normal;
- **Calcificação metaestática**, por sua vez, ocorre em tecidos inicialmente normais, como um resultado de um metabolismo de cálcio anormal (normalmente com níveis elevados de cálcio no sangue).

Esses dois tipos de calcificação podem agir sinergicamente.

Na tabela 3.2-A, pode-se observar alguns exemplos de calcificação. A calcificação distrófica pode ser encontrada em válvulas cardíacas "homografts" ou bioprotéticas, em

bombas cardíacas, em dispositivos intra-uterinos (DIU), em próteses urinárias, e em lentes de contato gelatinosas. A calcificação pode ocorrer tanto em tecidos sintéticos ou de origem biológica, implantados em sistema circulatório, em tecidos conectivos ou em outras localidades (tabela 3.2-A).

A fase mineral encontrada nesses processos de calcificação é um fosfato de cálcio pouco cristalino, denominado apatita, que pode normalmente ser relacionado com a hidroxiapatita, o mineral que fornece rigidez estrutural para ossos (fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Normalmente, a mineralização é aumentada em locais de intensa deformação mecânica e na presença de infecções.

Outro fato importante é que a calcificação pode ocorrer:

- na superfície do implante (**calcificação extrínseca**), comumente associada a células e tecidos aderidos;
- dentro da estrutura dos componentes (**calcificação intrínseca**) (Pathak et alli, 1996).

Tabela 3.2-A: Aparelhos e próteses afetados por calcificação (Pathak et alli, 1996).

CONFIGURAÇÃO	BIOMATERIAL	RESULTADO
Próteses de válvulas cardíacas	Pericárdio bovino ou válvula aórtica suína pré-tratada com glutaraldeído Poliuretano	Obstrução da válvula ou enrijecimento (incompetência)
Bexigas de assistência cardíaca ventricular	Poliuretano	Disfunção por enrijecimento ou vazamento
Enxertos vasculares	Homoenxertos aórticos Enxertos de Dacron	Obstrução do enxerto ou enrijecimento
Lentes de contato gelatinosas	Hidrogéis	Opacificação
Próteses urinárias	Borracha de silicone ou poliuretano	Incontinência e/ou infecção

A degeneração por calcificação das válvulas cardíacas bioprotéticas pré-tratadas com glutaraldeído é o principal exemplo de uma disfunção significativa do ponto de vista clínico de um aparato médico devido a mineralização. Centenas de milhares de próteses obtidas a partir de válvulas aórticas suínas ou a partir de pericárdio bovino preservados com glutaraldeído, têm sido implantados em pacientes desde 1971. Entretanto, mais da metade dessas válvulas passam a falhar dentro de 12 a 15 anos. Quase todas as válvulas biológicas apresentaram enrijecimento ou nódulos devido a calcificação intrínseca. O mesmo ocorre com os homoenxertos (válvulas humanas) retiradas de pacientes mortos, que são esterilizados, preservados e reimplantados em outro indivíduo.

3.3. Modelos experimentais de calcificação

Acredita-se que os mecanismos da calcificação patológica tenham muita similaridade com a mineralização normal dos ossos. De fato, muitos pesquisadores têm tentado explorar a calcificação em biomateriais para se criar novos tecidos rígidos.

A calcificação, nesses casos, deixa de ser um fato indesejável, para se tornar um mecanismo muito interessante, que pode auxiliar na regeneração de ossos e em aplicações onde se deseja resistência mecânica.

A grande maioria dos processos de calcificação associados a biomateriais, reportados como a mineralização de membranas celulares pré-existentes, adsorvidas ou mortas, são associados com a deposição de várias proteínas capazes de se ligar ao cálcio; e o aparente incentivo da mineralização devido a tensões mecânicas. Todos esses fatos são também comparáveis com os aspectos essenciais da mineralização de ossos.

A calcificação devido a células e membranas deve ocorrer em parte devido à alta concentração de fósforo normalmente existente nas membranas celulares e nos ácidos nucléicos. Além disso, tais membranas contêm altos níveis de fosfatase alcalina, uma enzima a qual se acredita possuir um papel importante na iniciação da mineralização que ocorre normalmente nos esqueletos. Esse mesmo papel pode ser desempenhado por proteínas que se ligam ao cálcio, tal como o ácido γ -carboxiglutâmico ou o ácido aminomalônico.

Já a deposição induzida por tensão pode estar associada como resultado da maior fricção e rompimento das membranas celulares.

3.4. Quitosana

Mesmo tendo sido descritas pela primeira vez em 1811 e nomeada por Oldier em 1823, a quitina e a quitosana não são tão bem conhecidas se comparadas com a celulose. Como a celulose, a quitina é um polissacarídeo composto de 2-acetamida-2-desoxi-D-glicose (poli(N-acetil-D-glicosamina)), obtido a partir de crustáceos, insetos, paredes celulares de fungos, animais inferiores, etc. O composto é insolúvel em água e solventes orgânicos e a sua disponibilidade como segundo composto orgânico mais abundante na Terra o faz potencialmente útil (Sandford, 1989).

A quitosana (poli(D-glicosamina)), por sua vez, é o nome usado para as formas pouco acetiladas da quitina e é composta primordialmente por glicosamina, 2-amino-2-desoxi-D-glicose. A glicosamina e sua forma N-acetilada são as formas mais abundantes de aminopolissacarídeos ocorrentes em polissacarídeos, glicoproteínas, paredes celulares, etc.

A quitosana é solúvel em solução ácida diluída e contém um grupo amino reativo que lhe dá natureza policatiónica. Este grupo amino tem extenso uso em modificações químicas. O composto também possui características como hidroflicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades anti-bacterianas e afinidade por proteínas.

As estruturas da quitina e quitina desacetilada (quitosana) são mostradas (Figura 3.4-A).

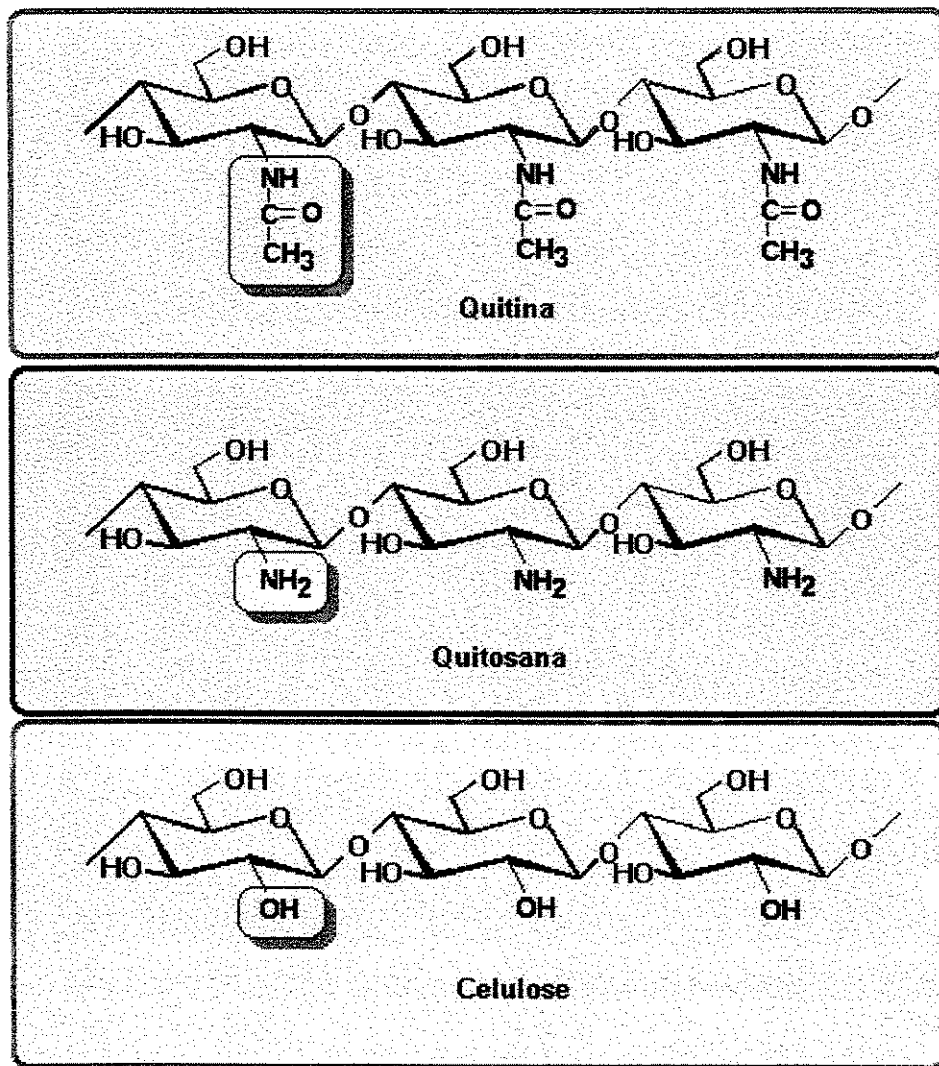


Figura 3.4-A:Estruturas da quitina, quitosana e celulose.

Ultimamente tem-se dirigido muita atenção à quitina e à quitosana por vários motivos:

- a) São materiais renováveis e biodegradáveis;

- b) Possuem grande aplicabilidade biotecnológica e médica;
- c) São biocompatíveis não apenas em tecidos animais, mas também em tecidos vegetais;
- d) Podem ser moldados na forma de esferas, fibras, colóides, filmes, etc;
- e) Possuem funcionalidade biológica: grupos amino e hidroxila quimicamente modificáveis;
- f) Consistem no segundo polímero natural mais abundante (somente perdendo para a celulose) em nosso ambiente.

A quitina é largamente distribuída na natureza mas, atualmente é extraída em larga escala a partir do exoesqueleto de crustáceos (caraquejo e camarão). As conchas de caraquejo consistem de quitina, proteína e CaCO_3 além de pequenas quantidades de MgCO_3 e pigmentos. A quantidade de quitina varia não somente no tipo de animal, mas também nas partes do mesmo.

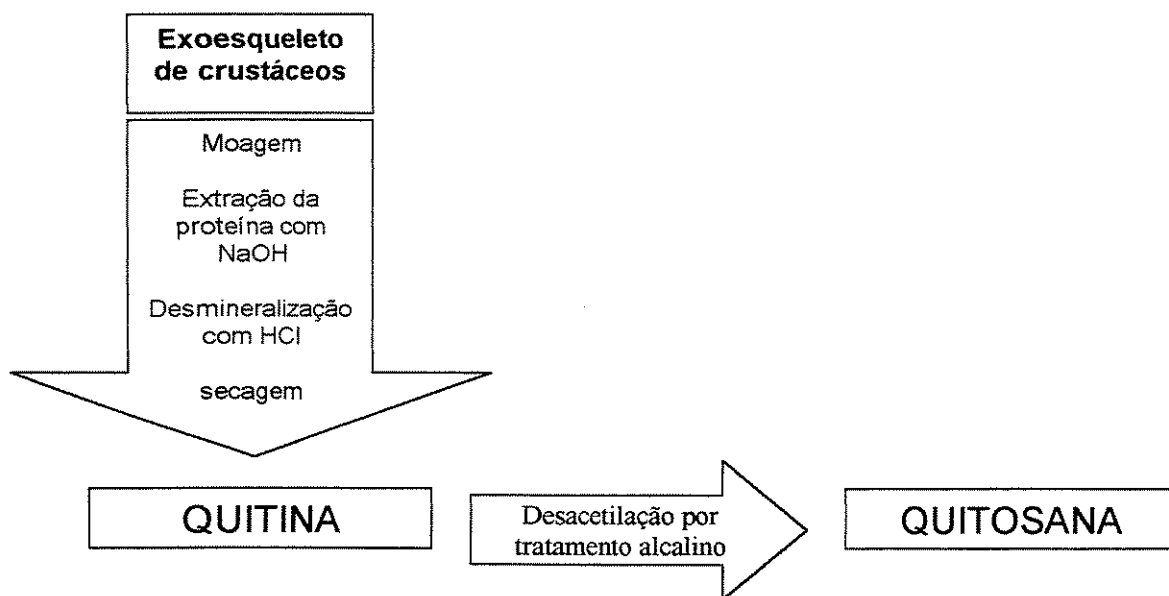


Figura 3.4-B: Esquema simplificado do processo de fabricação de quitina e quitosana.

A quitosana tem sido usada, nos últimos anos, pelo governo japonês, como um floculante natural para o tratamento de águas no Japão. A aprovação (no Japão, EUA (FDA) e Europa (Alemanha, por exemplo)) de seu uso como ingrediente para produtos de beleza (para pele e cabelo) tem também aumentado o interesse industrial por esse material.

O uso médico da quitosana tem sido feito na forma de agentes hemostáticos, sistemas de liberação controlada de drogas, agente hipocolestêmico, curativos, entre outras. Em todos esses casos, as propriedades-chave da quitosana, natural ou modificada, são: 1) biocompatibilidade; 2) atoxicidade, já que seus subprodutos de degradação são metabólitos conhecidos; 3) capacidade de aumentar a cicatrização de feridas; 4) capacidade de absorver líquidos e de formar camadas e coberturas protetoras; 5) ligação seletiva a lipídios ácidos, consequentemente abaixando níveis de colesterol no plasma sanguíneo (Sandford, 1989).

A quitosana também foi testada como bandagem protetora para olhos e se mostrou viável para ser usada como material para lentes de contato; quando fabricada em forma de fibras fortes, pode ser usada como material de sutura; na área biotecnológica, é usada para imobilizar células e enzimas e, particularmente, quando fabricada na forma de microesferas e reticulada para aumentar a estabilidade, pode ser utilizadas nos processos de separação e purificação de bioprodutos.

Alguns estudos de quitosana derivatizada (com alguns grupos funcionais modificados), mostram também bons resultados: sabe-se que a implantação de N-carboximetil quitosana induz neovascularização quando implantados em tecidos animais, o que demonstra a sua biocompatibilidade; quando usados com colágeno, pode ser usada como matriz de cultura de células; em experiências com gatos, houve a progressiva deposição de fibras de colágeno concomitante à absorção da quitosana quando esta foi utilizada como reposições (resultados de 60 dias).

Apesar de todas as suas variadas aplicações, a quitosana ainda foi pouco explorada como biomaterial associado a calcificação (hidroxiapatita). Mesmo como material bioabsorvível (implantes) ou como material a ser usado em processos biotecnológicos (como resina cromatográfica, por exemplo).

3.4.1. Membranas de quitosana

Com o recente interesse pela quitosana como um recurso natural, muitos estudos sobre corpos porosos e densos formados com esse material têm sido realizados. Uragami (1997A) estudou a preparação de membranas de quitosana destinadas à separação de água-etanol por pervaporação e também de membranas derivadas, heparinizadas, para imobilização de enzimas e transporte de espécies iônicas (Uragami, 1997B). Ren e Jiang (1998) estudaram o processo de transporte da solução água-etanol em membranas de quitosana natural e reticulada com ácido sulfúrico. Sakurai (1997) estudou membranas de quitosana aplicadas à separação e concentração de proteínas. Rodriguez-Sanchez e Rha (1981) estudaram a formação de glóbulos porosos de quitosana obtidos pela coagulação

de gotas de solução de quitosana em solução de NaOH, para uso como unidade estrutural similar à estrutura celular, para liberação controlada de ingredientes em alimentos. Estas estruturas teriam larga aplicação na indústria de alimentos, podendo simular a "suculência" das estruturas naturais de frutas ou carnes.

A preparação e utilização das estruturas de quitosana, sejam elas porosas ou densas, explora a natureza policatiónica da quitosana. Todas essas estruturas são normalmente sintetizadas por secagem ou coagulação de soluções aquosas de quitosana levemente acidificadas (a quitosana é composta de grupos amino protonáveis e torna-se solúvel em meios polares a pH's baixos). Posteriormente, podem ser realizadas modificações ou derivatizações específicas dos grupos funcionais, de acordo com a utilização final.

Essa versatilidade da quitosana permite sua conformação em formas tão variadas, quanto aplicáveis: fibras, glóbulos, membranas, etc.

3.4.2. Modificações químicas da quitosana

3.4.2.1. Reação com glutaraldeído

Para tornar a quitosana quimicamente mais inerte e resistente ao meio ácido, costuma-se bloquear os grupos amino com um agente bifuncional.

A natureza e o mecanismo da rede tridimensional formada pelo gel de quitosana e seu desvio do comportamento não-hookeano foi bem estudado (Kienzle-Sterser et alli, 1980). Estudos da análise dos dados reológicos também indicaram que a reticulação varia com o grau de diluição e a conformação das cadeias de quitosana durante a coagulação, com a remoção do solvente ácido.

O agente reticulante escolhido para a matriz de quitosana foi o glutaraldeído ou 1,5 pentanodial ($HOC-(CH_2)_3-COH$). Este agente bifuncional é extensamente utilizado em imobilização e reticulação de proteínas através de seus grupos amino residuais, além de ser um método simples, barato e conveniente para ligantes sensíveis a pH alcalino. A reticulação normalmente é obtida utilizando-se um excesso do agente bifuncional que proverá a superfície da matriz de quitosana com grupos diferentes das aminas iniciais da quitosana.

A ligação covalente entre o grupo amino e o grupo aldeído terminal do glutaraldeído é irreversível e resiste a extremos de pH e temperatura. Embora haja propostas de mecanismos diferentes para a reação entre grupos aldeído da matriz e

grupos amino (figura 3.4.2.1-A), nenhum destes mecanismos explicam plenamente os resultados experimentais da literatura (Petro et alli, 1996).

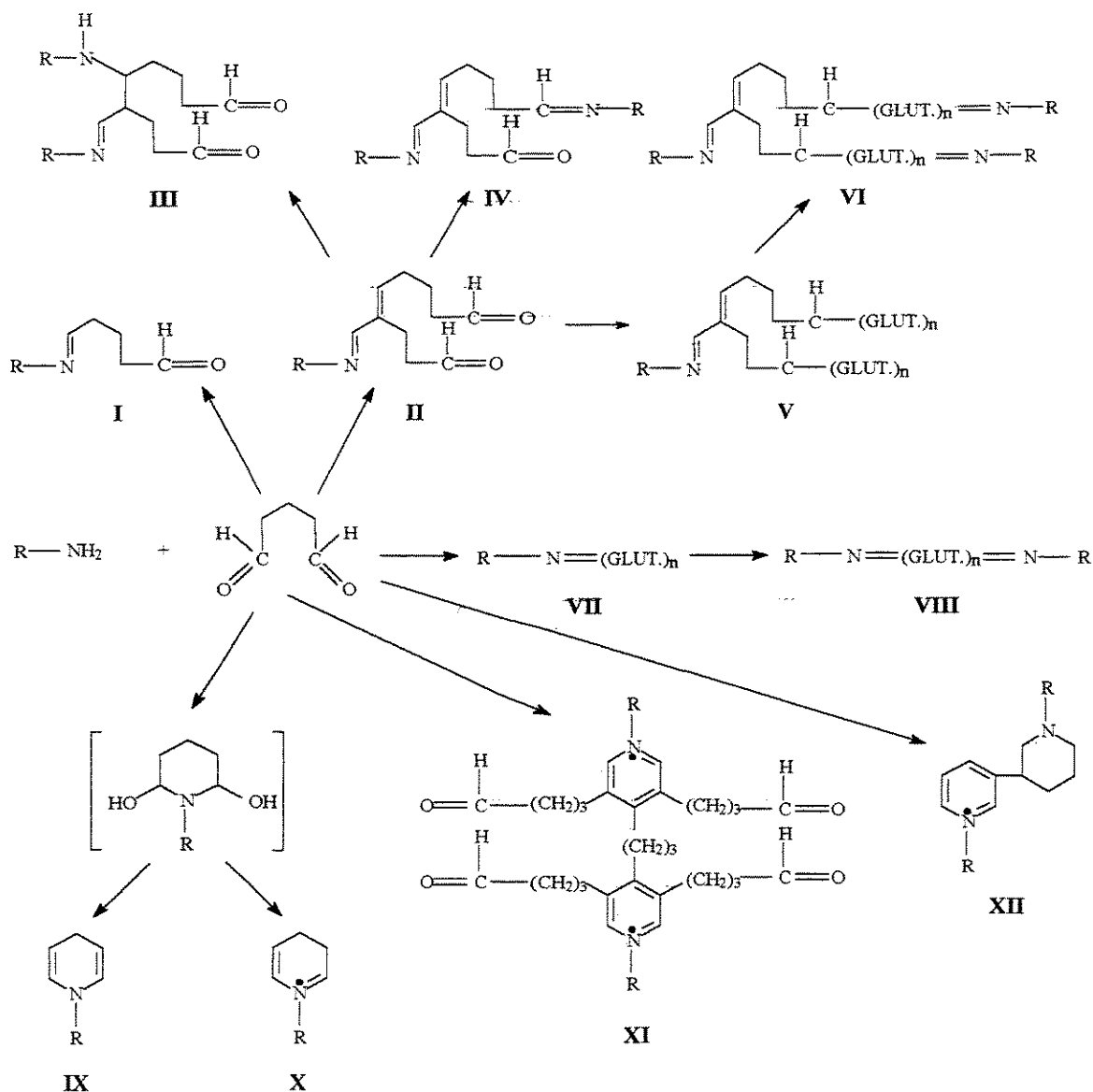


Figura 3.4.2.1-A: Esquema das reações aldo-amino; as estruturas III, IV, VI, VIII representam as reticulações entre cadeias poliméricas (Simionescu et alli, 1991).

O processo de reticulação por glutaraldeído é rápido e associado à polimerização do glutaraldeído (Eillet e Gull, 1972). A qualidade da reticulação precisa ser avaliada quanto as variáveis concentração, tempo de contato, temperatura e pH.

O tempo de contato e concentração para a fixação são importantes para a determinação da natureza da estrutura produzida (Yoshioka et alli, 1995; Yamauchi e Mechanic, 1988). O uso de altas concentrações geram extensas reticulações superficiais,

resultando numa rápida polimerização do sítio. Este fato prejudica a difusão de novas moléculas fixantes para os interstícios por impedimento estérico (Ruijgrok et alli, 1994).

A molécula de glutaraldeído não liga espaço maior que 1,5 nm. O fato, em si, justifica a polimerização do glutaraldeído para ligar maiores espaços inter e intra-moleculares. A polimerização é aumentada por concentração de glutaraldeído acima de 0,5% em peso, pH alcalino, temperatura e, de modo adicional, pela ação catalisadora dos grupos amino.

3.4.2.2. Adsorção com poli(ácido acrílico) (PAA)

O uso de policátions e poliânions é uma prática bastante difundida nos estudos de ciência de polímeros e síntese de cerâmicos. Isso se deve às características singulares destas espécies em meio aquoso. Apesar de disseminadas, ainda busca-se um total conhecimento das interações polieletrólito-cerâmica.

A maioria desses estudos tem sido conduzida para se entender os fatores que controlam a nucleação e a orientação da cristalização. Stupp e seus colaboradores sintetizaram apatitas orgânicas por nucleação e crescimento de cristais destas num meio contendo poliaminoácidos ou polieletrólitos sintéticos orgânicos (Stupp et alli, 1992; Stupp et alli, 1993).

Alguns estudos já comprovaram que poli(ácido acrílico) e quitosana interagem de maneira muito conveniente para serem explorados na forma de redes interpenetrantes de polímero (Wang et alli, 1997). Recentemente, a complexação interpolimérica entre pares de polímero através de forças de ligação secundárias (como a interação eletrostática, pontes de hidrogênio, força de Van der Waals e interação hidrofóbica) tem atraído muito a atenção, principalmente na área biológica, pois esses tipos de interação possuem um papel fundamental nos processos biológicos. Estudos nessa área ajudam no entendimento de uma série de fenômenos biológicos importantes incluindo a auto-organização de proteínas e reconhecimento molecular. Zhang and Gonsalvez (1995) procuraram usar da interação de quitosana e poli(ácido acrílico) para modelar a formação de nácar, usando-se quitosana como substrato e poli(ácido acrílico) (PAA) de baixo peso molecular como um aditivo em vez de proteínas complexas, em uma solução supersaturada de carbonato de cálcio utilizada para produzir a cristalização. De forma similar, Furlan (Furlan et alli, 1996) estudaram a adsorção de íons cálcio em copolímero quitina-ácido acrílico.

No presente trabalho, procuramos usar PAA para tornar a superfície da quitosana mais polianiônica que, como relatado em outros trabalhos, apresenta uma capacidade

muito grande de ancorar cátions, o que, em tese, poderia ajudar no processo de calcificação.

3.5. Compostos de cálcio

Os fosfatos de cálcio representam uma classe extremamente vasta de minerais, orgânicos ou não, com inúmeras possibilidades de hábitos cristalinos disponíveis dependendo da composição e das condições nas quais foi sintetizado.

A hidroxiapatita é o fosfato de cálcio mais estudado, pois é o principal componente cristalino do osso. Além dela, outros fosfatos de cálcio também estão presentes nas diferentes etapas do desenvolvimento ósseo, como por exemplo, o fosfato de octacálcio (OCP) $[\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$, a monetita (CaHPO_4), a brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e fosfato de cálcio amorfo (ACP), uma substância com composição mal definida, que provavelmente apresenta uma fórmula que se aproxima de fosfato de cálcio $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ e de pirofosfato de cálcio ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$).

Em sistemas orgânicos, é muito raro encontrar-se fosfatos de cálcio cristalinos, sendo mais comum a existência de materiais mais amorfos ou pouco cristalinos, simplesmente denominados como apatitas¹.

Mesmo a apatita que compõe o esmalte dental, considerada a mais cristalina produzida por organismos vivos, apresenta baixo grau de cristalinidade. Isto se deve à possibilidade de troca de íons:

- OH^- da hidroxiapatita por F^- ou Cl^- , resultando em fluorapatita e cloroapatita;
- Ca^{2+} por outros íons bivalentes com diâmetro maior que 0,97 Å;
- Íons fosfato por carbonatos e sulfatos;

gerando uma variedade grande de sais com estrutura semelhante a de hidroxiapatita (Nordström, 1990).

A hidroxiapatita que apresenta sítios de fosfato substituídos por carbonatos, por exemplo, é biologicamente mais reativa que o mesmo composto estequiométrico. Isto mostra a conveniência natural de que os ossos sejam constituídos por hidroxiapatita contendo carbonatos em vez de serem constituídos apenas pelo composto estequiométrico (com razão molar $\text{Ca/P} = 1,67$).

¹ A apatita apresenta fórmula geral $(\text{Ca}, \text{Z})_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{Y})(\text{OH}, \text{X})_2$, onde $\text{Z} = \text{Mg}^{2+}, \text{Sr}^{2+}, \text{Ba}^{2+}$; $\text{Y} = \text{HPO}_4^{2-}, \text{CO}_3^{2-}$, $\text{X} = \text{Cl}, \text{F}$. No entanto, esta é uma definição de estrutura, podendo apresentar várias composições. As apatitas pertencem ao sistema hexagonal, grupo $\text{P6}_3/\text{m}$.

3.6. Adsorção de proteínas

A adsorção de proteínas é utilizada em sistemas que a explorem como parte ou todo de um processo de recuperação e/ou purificação de moléculas. O fenômeno de adsorção envolve múltiplas interações entre a molécula alvo (adsorbato) e o adsorvente. Pode-se deste modo, traçar correlações fortes, a partir dos tipos de interação existentes, entre parâmetros como: a capacidade de adsorção, a natureza química e estrutural das espécies envolvidas. Este fato possibilita o uso dos ensaios de adsorção também como método analítico, para caracterizar tanto os diversos adsorventes quanto as espécies moleculares, desde que as características das espécies químicas envolvidas no processo de adsorção sejam bem conhecidas.

3.6.1. interações de proteínas como adsorbato

As interações entre as proteínas e os diversos adsorventes são combinações de forças intermoleculares e qualquer parâmetro do solvente que as possa afetar, tais como: pH, força iônica, temperatura ou agentes dissociantes, desestabilizará o complexo adsorvente-proteína. A natureza da interação não pode ser pré-definida e portanto as condições de eluição, normalmente são encontradas de modo empírico.

A figura 3.6.1-A mostra os principais tipos de interações envolvidas nos fenômenos de adsorção.

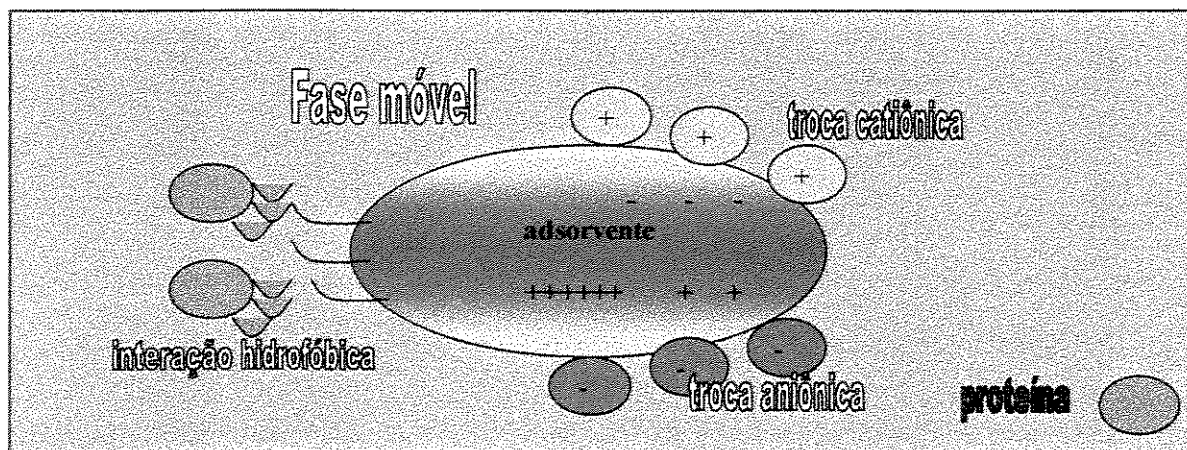


Figura 3.6.1-A: Esquema de técnicas cromatográficas baseadas nas propriedades da proteína.

A força iônica é usada para dessorção das proteínas dos sítios de ligação onde predominam interações iônicas. O aumento da concentração de íons no meio bloqueia a interação do sítio com a molécula alvo, permitindo sua eluição. Pode-se também utilizar

para o processo de dessorção a diminuição da força iônica, quando interações hidrofóbicas preponderam na adsorção.

O pH altera o grau de ionização dos grupos carregados. A sua variação para valores baixos, altera a carga na superfície de ligação por pontes salinas com íons opostos, podendo-se reduzir a força da interação. Em princípio, um aumento de pH também pode afetar a eluição, mas não é comum na prática em processos cromatográficos.

A adsorção hidrofóbica pode ser abordada em termos da contribuição entrópica da água estruturada deslocada nos domínios hidrofóbicos e também pela concentração salina do meio. A estrutura da proteína sofre influência dos íons presentes ("salting-out"), que competem pelas moléculas de água e, que deste modo altera a solubilidade da proteína. Há íons que diminuem a disponibilidade de água dos resíduos de aminoácidos da proteína, este fato aumenta a tensão superficial e promove a interação hidrofóbica. Outros íons ("salting-in"), por sua vez, podem ocasionar o efeito inverso, prevenindo a interação hidrofóbica por desorganizar a estrutura da água do meio. Pode-se ver na figura 3.6.1-B o comportamento destes íons frente a solubilidade de uma proteína.

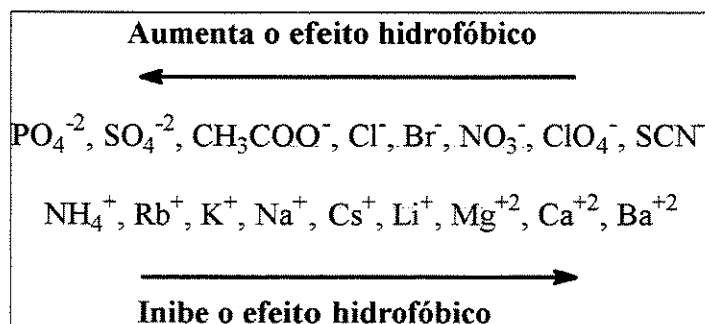


Figura 3.6.1-B: A influência dos íons na solubilidade da proteína através nas interações hidrofóbicas (adaptado de Hofmeister, 1888; Shih, Prausnitz e Branch, 1992).

Pode-se mostrar pelo exposto acima que o tampão através de seus íons pode afetar o processo de adsorção, ou refletindo na formação de um complexo estável entre o sítio de ligação e a molécula protéica a ser purificada ou desestabilizando o complexo, pois o processo de interação é conduzido por uma variedade de forças moleculares. Se a interação possui um caráter hidrofóbico acentuado, um aumento da força iônica e/ou pH poderá beneficiar a adsorção.

Os outros tipos de interações podem ser reforçados por adição de cátions metálicos divalentes ou fatores específicos capazes de preservar uma particular estrutura conformacional da proteína, para garantia de sua atividade.

3.6.2. Adsorção de proteínas em hidroxiapatita (HA)

A cromatografia líquida com hidroxiapatita (HA) nos servirá nesse trabalho, como uma referência, já que seu sistema é largamente estudado na literatura. Trata-se de uma técnica eficiente para a separação de proteínas, ácidos nucleicos e vírus em sistemas aquosos. Em geral, a utilização de condições a pH maiores que 5 é requerida, já que nestas faixas a HA é termodinamicamente estável.

O comportamento cromatográfico de proteínas ácidas ($pI \leq 7$) é diferente das de proteínas básicas ($pI \geq 7$).

Vários trabalhos (Kawasaki, 1991) mostraram que a cromatografia de HA assemelha-se muito à cromatografia de troca iônica, e que os resíduos de aminoácidos laterais dos polipeptídios, como grupos carboxila ($-\text{COO}^-$) para os polipeptídios ácidos ou amino (NH_3^+) para os básicos, são geralmente os grupos funcionais responsáveis pela adsorção na superfície da HA.

O fato de que as concentrações molares de eluição de proteínas ácidas são geralmente aumentadas em sistemas com KCl, NaCl, CaCl_2 e MgCl_2 , permite confirmar que o mecanismo cromatográfico envolvido para proteínas ácidas em HA, assemelha-se à cromatografia de troca aniônica, enquanto que para as proteínas básicas, existe uma similaridade com a cromatografia de troca catiônica, onde há competição das espécies protéicas com os cátions presentes no meio pela adsorção na superfície de HA.

O uso de espécies protéicas puras e o conhecimento do adsorvente sintetizado permitiram, neste trabalho, estimar as interações envolvidas e o posicionamento dos íons envolvidos na estrutura dos depósitos das espécies calcificadas sobre a matriz de quitosana com e sem reticulação. E estas informações preliminares poderão mostrar a potencialidade do uso deste material como adsorvente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo é dividido em cinco seções: 1) a síntese de membranas de quitosana; 2) o seu tratamento com glutaraldeído; 3) e com poli(ácido acrílico); 4) os ensaios de calcificação propriamente ditos e 5) a adsorção de proteínas em substratos de quitosana calcificados.

4.1. Síntese das membranas de quitosana

Preparação da solução de quitosana

Uma solução a 2,5% (em massa) foi preparada pela dissolução 20g de quitosana extraída de casca de caranguejo (Sigma, St. Louis, MO - número de produto C 3646, mínimo de 85% de quitina desacetilada) em 975ml de solução de ácido acético (contendo 50ml de ácido acético concentrado e 925ml de água milli-Q).

Os flocos hidratados em meio ácido, foram dispersos por agitação e guardados por 1 semana a 4°C para completa solubilização. A solução viscosa foi filtrada a vácuo, através de uma placa sinterizada aquecida (a 60°C) para a remoção da matéria insolúvel, obtendo-se um filtrado límpido e homogêneo.

Essa solução foi estocada a 4°C, em frasco de polietileno.

Preparação de membranas densas

Membranas densas são preparadas espalhando-se a solução de quitosana em uma placa de vidro com bordas; permitindo-se a evaporação do solvente a 60°C em estufa, obtendo-se uma película transparente e resistente mecanicamente. Em seguida, as películas foram imersas em solução de NaOH 1N a 25°C por 24h e lavadas repetidamente com água para remover completamente o NaOH, sendo finalmente estocadas em água milli-Q a 4°C.

Algumas membranas foram reticuladas com glutaraldeído, preparadas pela imersão das membranas de quitosana em 50 ml de solução de glutaraldeído cuja concentração variou de 0,05 a 0,5% do peso por tempos que variaram de 1 a 10 minutos, a 21°C ou 4°C, de acordo com o grau de reticulação a ser obtido (esta etapa do trabalho é explorada na seção posterior). As membranas foram repetidamente lavadas com água pura e também foram estocadas em água milli-Q a 4°C (foram produzidas membranas de aproximadamente 15 µm de espessura).

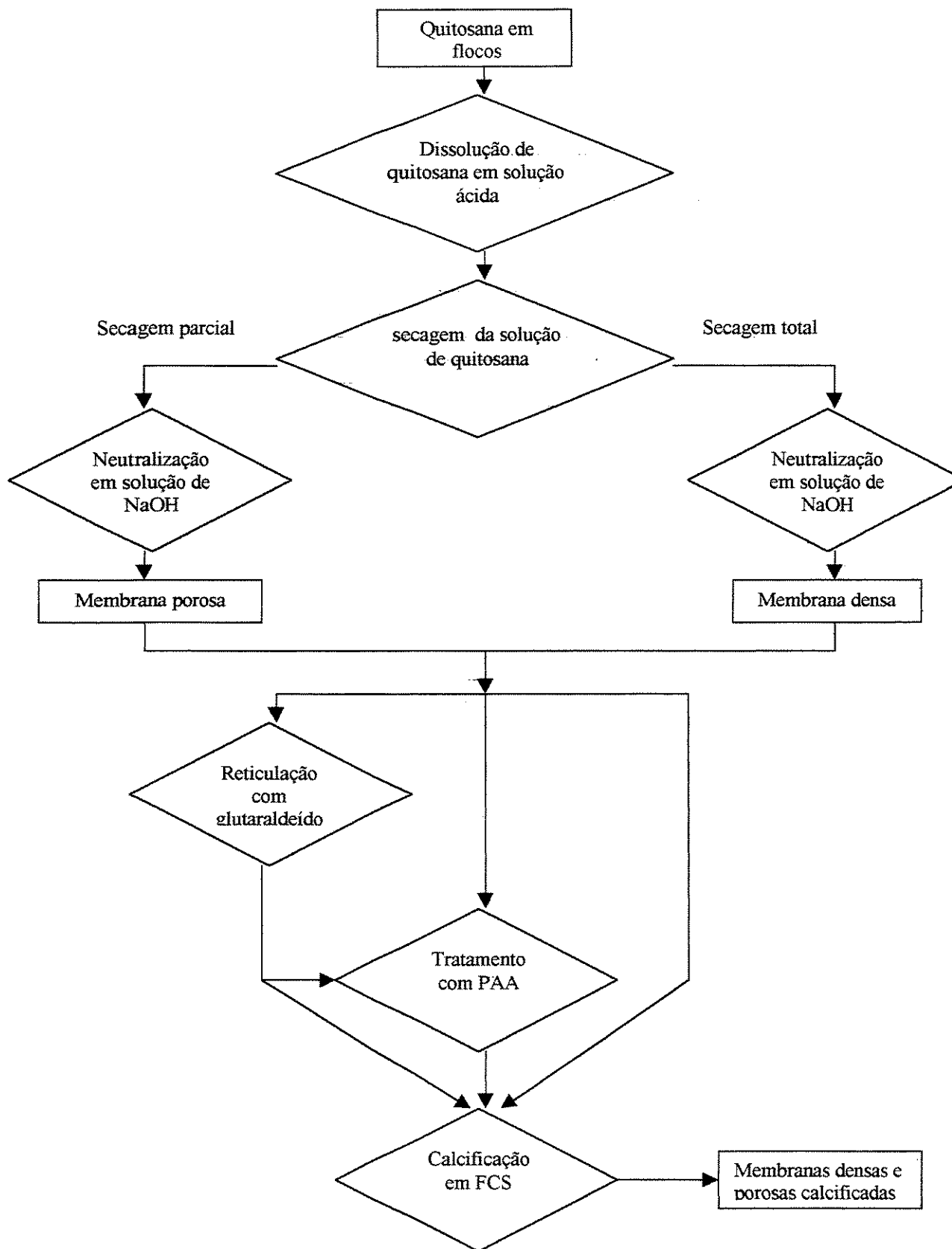


Figura 4.1-A: Fluxograma dos processo experimental de obtenção de membranas, seu tratamento e sua calcificação.

Preparação de membranas porosas

Membranas porosas foram preparadas espalhando-se a solução de quitosana preparada previamente sobre placas de petri de vidro e deixadas a 60°C por 60 min para que o solvente seja parcialmente evaporado (a solução chega a cerca de 50% do peso inicial). Em seguida foram mergulhadas em solução de NaOH 0,5 N e deixadas por 48h a 25°C. Após esse período, as membranas apresentavam um aspecto opaco, sendo então lavadas e estocadas a 4°C em água milli-Q.

A reticulação destas membranas procedeu-se da mesma forma que a apresentada no item anterior, como para as membranas densas.

As membranas preparadas desta forma apresentaram espessura de cerca de 1 mm.

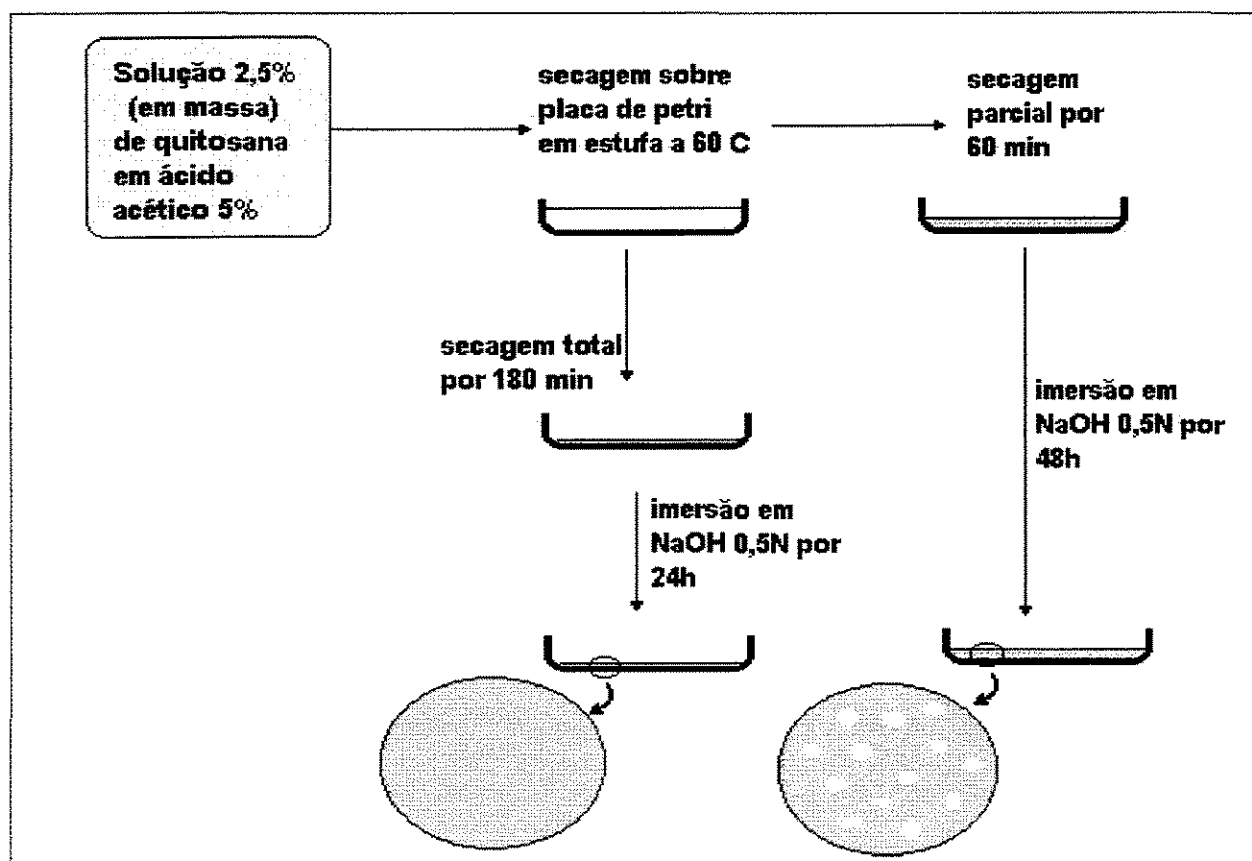


Figura 4.1-B: Esquema utilizado na fabricação de membranas de quitosana.

Sabe-se que a porosidade das membranas densas é afetada pela concentração da solução de quitosana que é submetida à coagulação e pelo meio coagulante

(concentração da solução básica). Para constataremos a influência da concentração do meio coagulante, repetimos o procedimento para fabricação de membranas porosas descrito acima, variando-se a concentração da solução de NaOH de 0,125, 0,25, 0,5 e 1,0 M. Estas membranas foram reticuladas com glutaraldeído, para que se mostrassem menos higroscópicas e resistissem mais à umidade do ar no meio, desde sua liofilização, até a observação no microscópio.

4.1.1. Caracterização da quitosana

4.1.1.1. Espectroscopia no IV

O espectro infravermelho de polímeros pode ser considerado simples levando-se em consideração o grande número de átomos envolvidos (Billmeyer, 1984). A análise vibracional de polímeros fornece informações sobre três importantes características estruturais:

- a composição química;
- a estrutura configuracional e conformacional;
- as forças interatômicas associadas às ligações de valência ou interações intermoleculares.

Devido à sua praticidade, o infravermelho é a ferramenta espectroscópica preferida na caracterização de polímeros e biopolímeros (Freeman, 1985). As amostras podem ser preparadas de diversas maneiras (pastilhas, filmes, fitas, etc.). Os dados obtidos podem ser tratados com subtração, adição, análise de fatores, deconvolução espectral e podem também ser usados quantitativamente (Koenig e Kormos, 1979).

No nosso caso, foram realizadas análises de IV das membranas densas (após lavagem e secagem ao ar), que são mecanicamente mais resistentes que as porosas. O fato de se conseguir filmes densos de quitosana, com pouca irregularidade de superfície propiciou o uso do aparato de ATR (attenuated total reflection - reflexão total atenuada), que permite o estudo químico da superfície do filme (parte que entrará em contato com a solução calcificante).

Foram obtidos espectros na faixa de 4000-650 cm^{-1} utilizando-se o instrumento FTIR da Nicolet Protégé 460, com o acessório ATR de ZnSe.

4.1.1.2. Conteúdo de N-acetila

Uma precisa determinação deste parâmetro é necessária, pois existe uma grande influência do grau de acetilação nas propriedades da quitosana e, por consequência, na sua aplicabilidade. Muitos métodos são sugeridos na literatura mas, infelizmente, existem grandes discrepâncias entre os valores por eles obtidos. Apesar dos métodos de titulação mostrarem uma imprecisão relativamente grande, eles são recomendáveis quando se trabalha com graus de desacetilação maiores que 5%, que é o nosso caso (~80%). O uso de determinações espectroscópicas para quantificação absoluta, tais como RMN e IV dependem de métodos de padronização para se estabelecer uma correlação entre o grau de acetilação e a absorbância observada, além da escolha de bandas convenientes e do uso de filmes de boa qualidade. Assim, para saber-se o valor absoluto de grupos amino disponíveis, a titulação potenciométrica mostrou ser o método mais eficaz (Raymond et alli, 1993).

O método consiste em adicionar-se uma quantidade conhecida de solução de HCl (0,02 equivalente/l) em excesso, a uma determinada massa de quitosana deixando-a tempo suficiente para protonar os grupos amino disponíveis (24h). Em seguida, titula-se a solução resultante com NaOH (0,1 equivalente/l) padronizado para obter-se uma curva típica de titulação potenciométrica. Dessa forma, através das inflexões das curvas, é possível determinar-se a porcentagem de grupos amino na quitosana.

A porcentagem de n-acetila é obtido através do seguinte cálculo:

$$\% = 1 - \frac{(V_{NaOH} \cdot C_{NaOH})}{(m_{quit} / M_{quit})}$$

Onde:

% = porcentagem de grupos n-acetila;

m_{quit} = massa de quitosana utilizada na titulação;

M_{quit} = massa molecular da unidade repetitiva da quitosana que contém um grupo amino (valor: 161 u.m.a);

V_{NaOH} = volume da solução de NaOH usada para neutralizar os grupos amino protonados;

C_{NaOH} = concentração molar da solução de NaOH usada na titulação.

4.1.1.3. Massa molecular

As dimensões das cadeias dos polímeros podem ser expressas de várias maneiras: massa molecular, grau de polimerização, raio de giro, volume hidrodinâmico,

etc. Além disso, devido à existência de cadeias poliméricas de tamanhos diferentes, pode-se gerar massas moleculares médias ponderadas por massa (M_w) e por número (M_n).

Devido às fortes interações de variadas origens que ocorrem no polissacarídeo e à dificuldade de se determinar a concentração do polímero usado (principalmente se a quitosana não é totalmente desacetilada), a massa molecular média é o parâmetro mais difícil de se determinar com precisão.

Apesar da possibilidade de se usar osmometria de membrana, medidas de espalhamento de luz estático, cromatografia de permeação em gel e cromatografia de exclusão estérica, a técnica mais usual e precisa para se obter a massa molecular média é a partir da medida de viscosidade intrínseca $[\eta]$.

A viscosimetria é um dos métodos mais utilizados para a caracterização de macromoléculas por ser simples e rápido. Para tanto, deve-se trabalhar numa condição diluída, usando-se um bom solvente. Utilizando-se o parâmetro de Mark-Houwink apropriado, pode-se calcular facilmente a massa molecular média (M_v) a partir da relação:

$$[\eta] = K \cdot M_v^a$$

É claro que os parâmetros K e a devem depender do grau de acetilação e do solvente.

Alguns autores propõem o uso de solvente composto de 0,2M de ácido acético mais 0,1M de acetato de sódio. Esse tampão tem a vantagem de estabilizar o pH (em 4,3) em uma larga faixa de concentração de quitosana e tal valor de pH é suficientemente baixo para assegurarmos que todos os resíduos estão sob a forma de sal de acetato. Além disso, independente do método, é melhor se caracterizar o grau de polimerização do que a massa molecular.

No nosso caso, utilizamos soluções em concentrações variando de 0,0025 a 0,5% em massa de quitosana. O solvente usado foi uma solução aquosa de 2% (0,33M) de ácido acético mais 0,3M de NaCl, o que segundo Pogodina et alii (1986), a 21°C, determina uma equação de Mark-Houwink de: $[\eta] = 3,41 \times 10^{-3} M^{1,02} \text{ cm}^3/\text{g}$ para a quitosana.

Para o cálculo de $[\eta]$ leva-se em conta que:

Viscosidade relativa: $\eta_{rel} = t/t_0$ (adimensional)

Viscosidade específica: $\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1 = (t - t_0)/t_0$

Viscosidade específica reduzida: $\eta_{esp \text{ red}} = \eta_{esp}/C$

Viscosidade Inerente: $\eta_{iner} = \ln(\eta_{rel})/C$

Viscosidade intrínseca: $[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0}(\eta_{iner}) = \lim_{C \rightarrow 0}(\eta_{esp \text{ red}})$

Onde t = tempo de escoamento da solução no viscosímetro;

t_0 = tempo de escoamento do solvente puro; no viscosímetro;

C = concentração em gramas de polímero em 100 ml de solução.

Construindo-se gráficos de $\eta_{\text{esp}} \times c$ e $\eta_{\text{iner}} \times c$ e extrapolando-se a uma concentração igual a zero obtemos o valor da viscosidade intrínseca $[\eta]$.

Assim, foram obtidos vários t correspondentes a cada c , num viscosímetro de Ostwald com capilar de 75 μm de diâmetro, num banho a 21°C.

4.1.1.4. Morfologia

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a análise morfológica das membranas densas e porosas foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Utilizamos o microscópio JEOL JXA-840 A Electron Probe Microanalyzer, do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMA) da Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM/Unicamp).

As amostras foram observadas após lavadas com água Milli-Q, liofilizadas, fraturadas a frio (com N_2 líquido) e cobertas com carbono por evaporação, a fim de torná-las condutoras e observáveis sob feixe de elétrons.

Utilizamos as condições de 15kV (branda) devido à natureza não-condutiva das amostras.

Microscopia de Força Atômica (MFA)

A microscopia de força atômica também foi utilizada para se observar a topografia das amostras num nível de detalhes maior que a oferecida pelo MEV. Nesse caso foram observadas apenas amostras densas, pois este tipo de microscopia requer amostras planas em nível micrométrico. As amostras foram secas à temperatura ambiente, em local protegido. Utilizamos o modo não-contato, no microscópio Autoprobe cp, da Park Scient. Instrument, gentilmente cedido pelo IFGW (Unicamp). A sonda/cantilever varreu uma área de 5x5 μm .

4.2. Reticulação das membranas de quitosana com glutaraldeído

As membranas de quitosana, preparadas conforme descrito no item anterior, foram reticuladas de modo controlado, para a obtenção de um caráter mais apolar, pois o glutaraldeído introduz porções hidrofóbicas metilênicas. As membranas são muito estáveis em pH neutro ou alcalino, mas dissolvem-se em meio ácido (acético, cítrico e clorídrico, etc). A reticulação com glutaraldeído as tornam mais resistentes do ponto de vista físico, químico e microbiológico.

Para a realização do estudo da influência da concentração de glutaraldeído, do tempo de imersão das películas na solução de glutaraldeído e da temperatura dessa solução no grau de reticulação obtido, foi traçado um plano fatorial.

Assim, foi usado como resposta, o grau de reticulação da quitosana ou incorporação de glutaraldeído em função de três fatores: tempo de contato, concentração de glutaraldeído e temperatura. O restante das variáveis foram mantidas constantes (pH= 8,00).

Um planejamento do tipo estrela centrada (Barros Neto et alli, 1995) apresentada na figura 4.2-A foi utilizado para cada temperatura. Utilizamos glutaraldeído (solução aquosa a 25%), em grau analítico, fornecido pela Nuclear.

A resposta (grau de reticulação) foi medida através de IV. Apesar do glutaraldeído apresentar uma absorção a 229 nm, esse método indireto mostrou-se pouco sensível aos intervalos de fatores escolhidos. O uso de determinações espectroscópicas, tais como RMN e IV dependem da escolha de bandas convenientes e do uso de filmes de boa qualidade. Desse modo, se a espectroscopia de IV é uma determinação fácil e rápida, ainda assim, muitas dificuldades e imprecisões devem ser transpostas. Métodos de padronização para correlacionar quantidade de grupos amino e intensidade de pico não foram necessários nesse estudo, pois trata-se de um estudo qualitativo, em que desejamos observar quais fatores influem de maneira mais acentuada na reticulação.

No espectro de IV das membranas de quitosana úmida (maneira como fizemos as medidas), escolhemos a intensidade dos picos 1077 cm^{-1} e 1036 cm^{-1} , referentes à amina, para compararmos com o pico a 1656 cm^{-1} , referente à água.

Os experimentos do plano fatorial foram realizados em duplicata da seguinte maneira: 50ml de solução de glutaraldeído eram preparados na concentração especificada no momento da realização do experimento. Colocavam-se duas tiras de 0,5 cm x 6,5 cm de membrana densa de quitosana na solução que era levemente agitada até completar-se o tempo especificado para o experimento. Em seguida, as amostras foram lavadas repetidamente com água pura e estocadas em água Milli-Q a temperatura ambiente (21°C). As membranas mostravam-se mais quebradiças após este processo.

Os espectros de IV foram extraídos com as membranas ainda úmidas, recém retiradas da água milli-Q, na faixa de $4000\text{--}650\text{ cm}^{-1}$, utilizando-se o instrumento FTIR da Nicolet Protégé 460, com o acessório ATR (reflexão total atenuada) de ZnSe.

Somente membranas densas foram usadas nesses experimentos, já que eram mais indicadas para a utilização da técnica ATR-IR pois apresentavam morfologia (superfície mais plana) e resistência mecânica adequada.

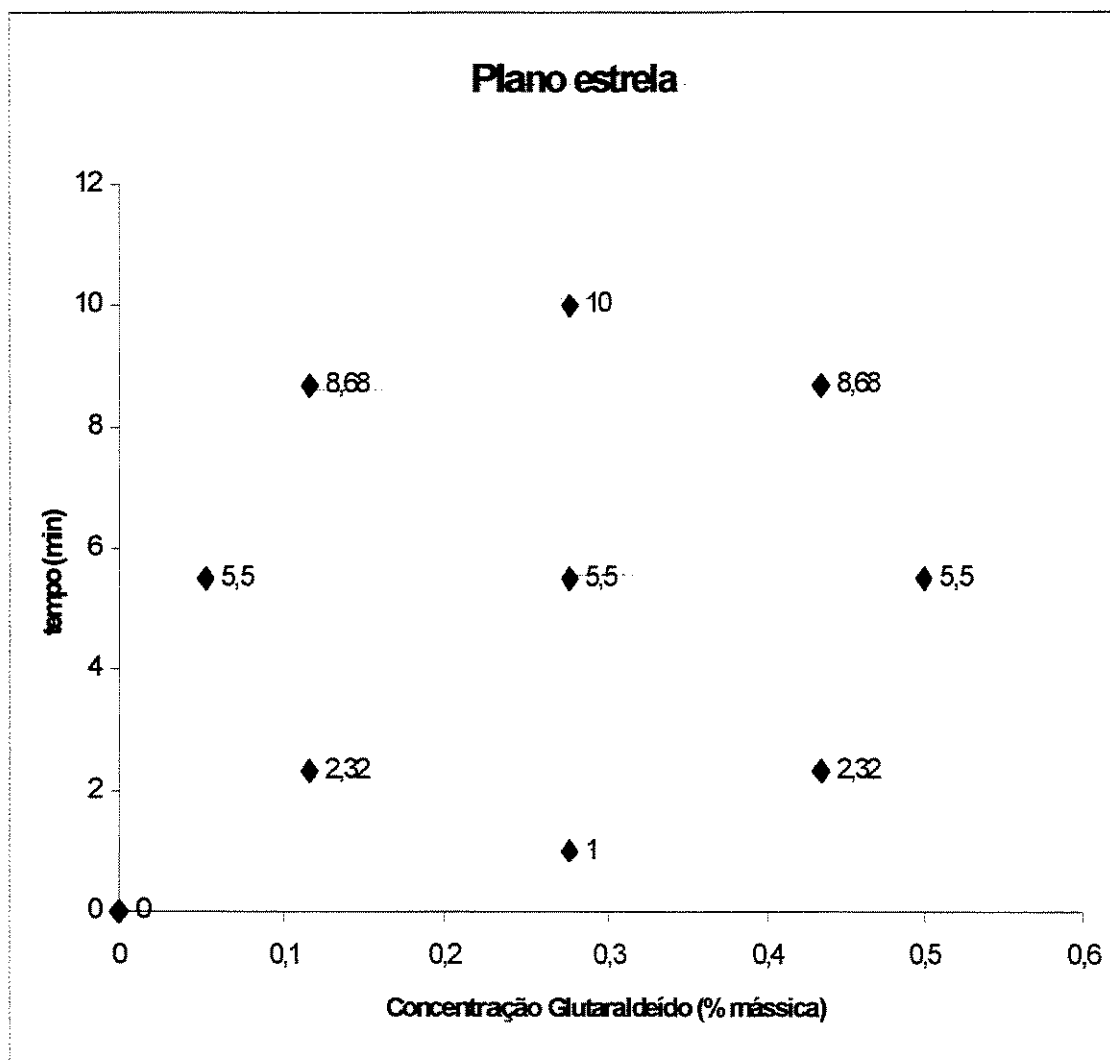


Figura 4.2-A: Plano fatorial usado no estudo da reticulação da quitosana com glutaraldeído.

A absorção de água também foi observada como variável de resposta do plano fatorial. A capacidade de absorção de água dos polímeros foi observada pesando-se as amostras recém retiradas da água de estocagem, grosseiramente enxugados com papel toalha e após secas em estufa a 100°C por 24h.

$$\% \text{ absorção água} = \frac{\text{massa úmida} - \text{massa seca}}{\text{massa úmida}} * 100$$

4.2.1. Caracterização das membranas tratadas com glutaraldeído

As membranas reticuladas também foram caracterizadas quanto à morfologia (MEV e AFM) e quimicamente (espectroscopia de IV), conforme feito para as membranas naturais (os métodos foram descritos no capítulo 3). Adicionalmente, fizemos as seguintes caracterizações:

4.2.1.1. Análise Termogravimétrica (ATG)

Análises termogravimétricas foram realizadas nas amostras de quitosana porosa naturais e reticuladas liofilizadas para observar o comportamento térmico dos compostos formados. Utilizou-se o Analisador Termogravimétrico TGA-7 da Perkin-Elmer do Departamento de Sistemas Químicos (DESQ) da Faculdade de Engenharia Química (FEQ/Unicamp). O aquecimento foi feito numa velocidade de 10°C/min, em atmosfera inerte de N₂, utilizando-se até 2mg de amostra, numa faixa de temperatura desde a ambiente até 360°C.

4.2.1.2. Difusão de íons

Para observar as diferenças de interação entre membranas densas naturais e reticuladas de quitosana, foram realizados ensaios de difusão de íons. Para tanto, construiu-se uma célula de difusão, cujas dimensões são mostradas na figura 4.2.1.2-B. A difusão de íons pode ser medida através da medida de concentração dos mesmos nos dois compartimentos da célula de medida de permeabilidade em função do tempo. Para tanto, usamos uma curva de calibração de condutividade x concentração. Utilizamos a bomba, o condutímetro e o software da BioRad Biologic Controller e Workstation, destinado à ensaios de cromatografia, adaptados à célula de difusão de acordo com a figura 4.2.1.2-A.

O método da célula de difusão foi introduzido por Northop e Anson (1928)

Os termos geométricos da célula podem ser agrupados em uma constante β denominada "constante da célula":

$$\beta = \frac{A}{L} * \left(\frac{1}{V_1} + \frac{1}{V_2} \right)$$

Onde: A - área de transferência

L- espessura da membrana

V1, V2 -volume dos compartimentos

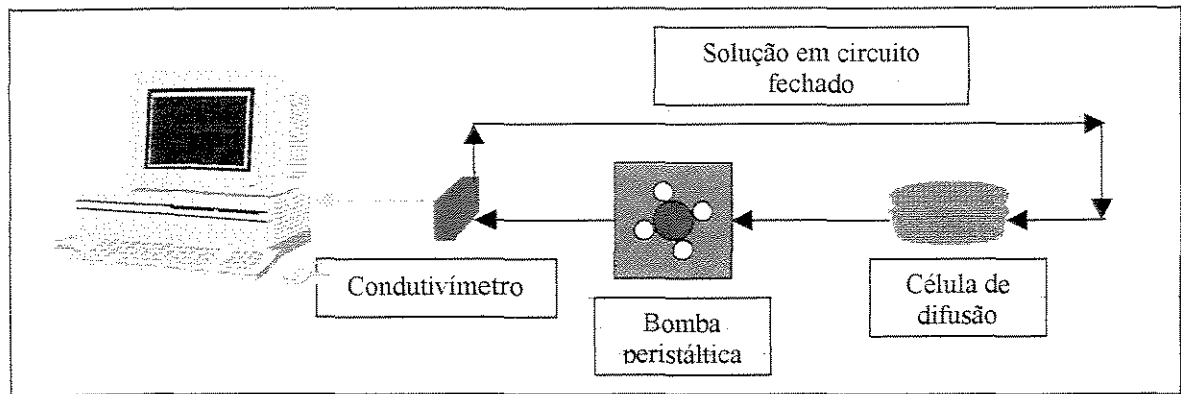


Figura 4.2.1.2-A: Esquema para medida de difusão de íons através da membrana.

No nosso caso, o diâmetro interno da célula é de 4 cm, e cada compartimento tem a mesma profundidade de 2,4 cm.

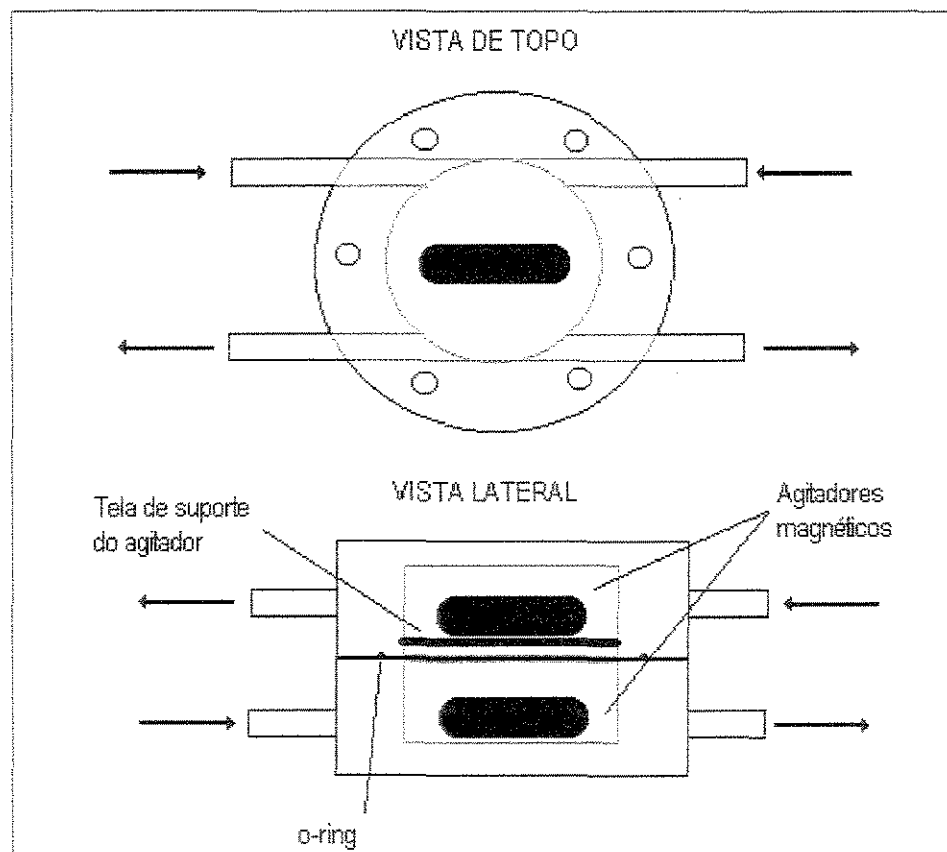


Figura 4.2.1.2-B: Célula utilizada no experimento de difusão.

Através do balanço de massa e da equação de Fick, chega-se à equação que relaciona as concentrações iniciais e finais em relação ao tempo:

$$\ln \left(\frac{C_f^1 - C_f^2}{C_o^1 - C_o^2} \right) = -\beta \cdot D \cdot t$$

Onde: C - concentração final ou inicial no compartimento 1 ou 2;

D - coeficiente de difusão;

t - tempo de difusão;

β - constante da célula;

índices; o - inicial; f - final; ¹ - compartimento 1; ² - compartimento 2;

Através das equações acima, torna-se possível obter D (coeficiente de difusão) para cada íon.

Utilizamos soluções dos cloretos dos principais cátions que estariam presentes na solução de calcificação: Na, K, Ca e Mg. A concentração inicial foi de 1,0 M.

4.3. Tratamento das membranas de quitosana com poli(ácido acrílico) - PAA

As membranas de quitosana sofreram adsorção de PAA (fornecido pela Polysciences) de modo controlado, para a obtenção de uma superfície química de carga oposta à originalmente disponível na quitosana.

Para a realização do estudo da influência da concentração de PAA e do peso molecular do PAA usado foi traçado um plano fatorial do tipo 2³ (figura 4.3-A).

Foi usado como resposta o grau de adsorção de PAA em função de dois fatores: concentração de PAA na solução e peso molecular do PAA usado. Temperatura, tempo de contato e pH foram mantidos constantes em 36,5°C, 14h e 8,00, respectivamente.

A resposta da adsorção de PAA foi medida através de IV e por espectrofotometria de UV, já que o PAA apresenta uma absorção a ~220 nm. Como afirmado nas seções anteriores, o uso de determinações espectroscópicas como o IV depende da escolha de bandas convenientes e do uso de filmes de boa qualidade.

No espectro de IV, escolhemos as intensidades dos picos 1400 cm⁻¹ (relativa à deformação C-O-C de carboxilas) e 1080 cm⁻¹ (relativa à amina primária), como referências à análise quantitativa.

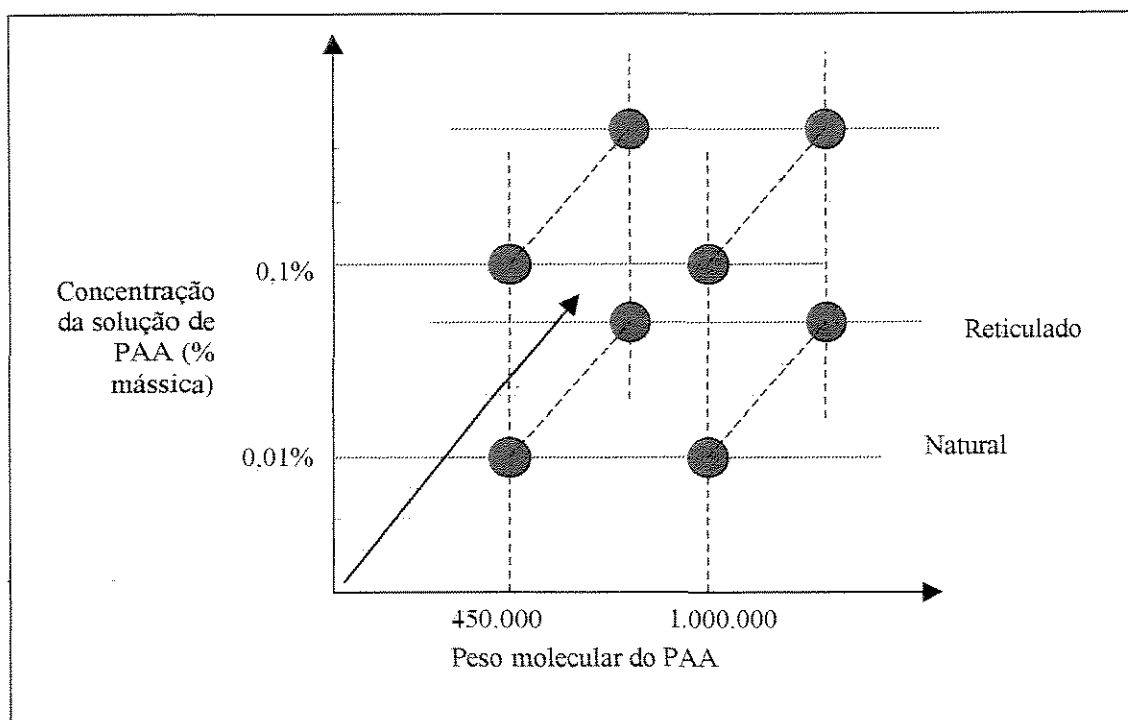


Figura 4.3-A: Plano fatorial para estudo da adsorção de PAA em quitosana.

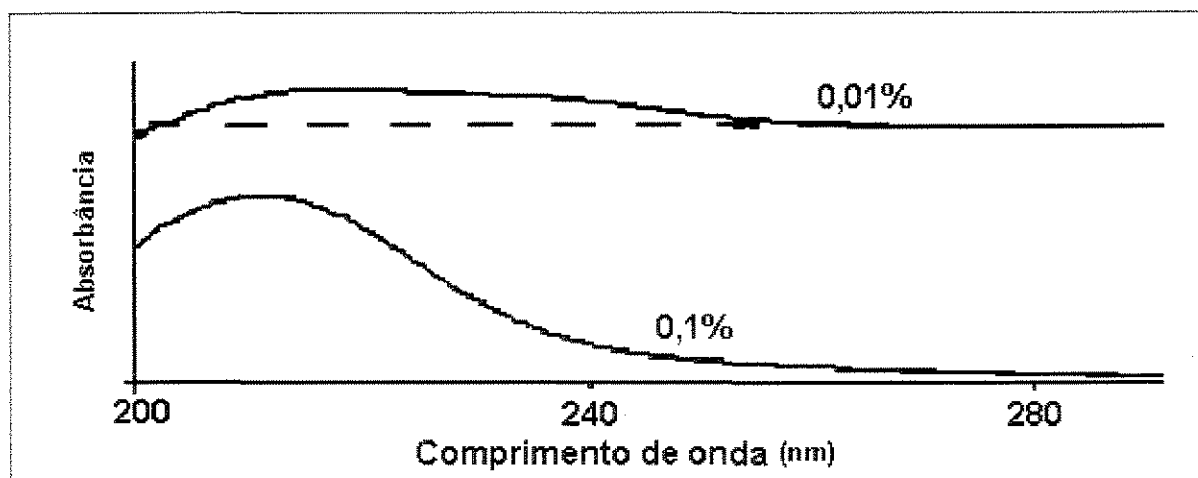


Figura 4.3-B: Espectro de absorção de solução aquosa de PAA, de acordo com a concentração mássica.

Os resultados do plano fatorial foram extraídos em duplicata da seguinte maneira:

1) Os espectros de IV foram extraídos com a membrana ainda úmida, recém retirada da água milli-Q, na faixa de $4000-650\text{ cm}^{-1}$ utilizando-se o instrumento FTIR da Nicolet Protégé 460, com o acessório ATR (reflexão total atenuada) de ZnSe.

Somente membranas densas foram usados nesses experimentos, já que eram mais indicadas para a utilização da técnica ATR-IR pois apresentavam morfologia (superfície mais plana) e resistência mecânica adequada.

2) na solução, foi medido a quantidade adsorvida de PAA, através do método de diferença, usando-se método de espectrofotometria de UV.

4.3.1. Caracterização das membranas tratadas com PAA

As membranas reticuladas também foram caracterizadas quanto às cargas (titulação potenciométrica), e quimicamente (espectroscopia de IV) conforme feito para as membranas naturais e reticuladas (os métodos foram descritos no item 4.2.1).

4.4. Ensaio de calcificação de quitosana *in vitro*

Todos os sais reagentes utilizados nesta seção foram fornecidos em grau analítico. Água Milli-Q foi utilizada em todas as soluções.

4.4.1. Ensaio de calcificação *in situ*

4.4.1.1. Preparação das matrizes (membranas) de quitosana para calcificação

Membranas de quitosana densas e porosas foram preparadas conforme o Capítulo 3. Posteriormente, parte das membranas foi reticulada com glutaraldeído e submetida a tratamento com PAA.

4.4.1.1.1. Reticulação

Conforme conhecimento adquirido com os ensaios de reticulação de quitosana com glutaraldeído, algumas membranas densas e porosas foram reticuladas de duas maneiras:

- a) reticulação branda: através da imersão de pedaços de quitosana ($\sim 4 \text{ cm}^2$) em 50 ml de solução de glutaraldeído (0,18%) por 2 minutos, a 21°C . Em seguida, foram lavadas repetidamente com água pura e estocadas em água Milli-Q a 4°C . As membranas mostravam-se mais quebradiças após este processo.
- b) reticulação severa: através de imersão de 20 pedaços (4 cm^2) em 100 ml de solução de glutaraldeído (0,25 %) por uma noite ($\sim 14 \text{ hs}$) a 21°C (pernoite à temperatura ambiente dentro de capela ligada e coberto com vidro de relógio).

Em seguida, as membranas foram lavadas repetidamente com água pura e estocadas em água Milli-Q a 4°C. As membranas apresentavam-se bastante quebradiças após este processo.

4.4.1.1.2. Tratamento com PAA

De acordo com o conhecimento adquirido com os ensaios de adsorção de PAA em quitosana, foi decidido utilizar-se PAA de peso molecular $PM = 450.000$ para tratar as amostras densas ou porosas com PAA.

Quatro pedaços de membranas de cada tipo (densa ou porosa, com ou sem reticulação severa com glutaldeído) foram colocados em 50 ml de solução de PAA 0,1% mássico. Estas permaneceram num banho termostático durante 14 h (pernoite) a 36,5°C.

4.4.1.2. Preparação da solução calcificante

A solução calcificante ou fluido corpóreo simulado (FCS) (Mucalo et alli, 1995) foi preparada para que apresentasse uma composição muito próxima de íons presentes no plasma sangüíneo humano. O FCS foi preparado em solução tampão de Tris/HCl (pH7,8) adicionando-se NaCl, KCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $NaHCO_3$, K_2HPO_4 e Na_2SO_4 conforme as composições da tabela 4.4.1.2-A.

Tabela 4.4.1.2-A: Concentração dos íons nas soluções calcificantes e no plasma sangüíneo, em mM.

	pH	Na	K	Ca	Mg	Cl	HCO_3	HPO_4	SO_4
plasma	7,4	142,0	5,0	2,5	1,5	103,0	27,0	1,0	0,5
1xFCS	7,8	142,5	5,0	2,5	1,5	178,0	4,5	1,0	0,5
1,5xFCS	7,8	213,7	7,5	3,75	2,25	267,0	6,7	1,5	0,75

As soluções calcificantes eram preparadas momentos antes do início dos ensaios de calcificação. Utilizávamos soluções salinas que eram previamente preparadas, para se fazer a mistura final:

Tabela 4.4.1.2-B: Tabela com os dados da fabricação de FCS 1,0 ou 1,5.

Soluções	concentrações	Volumes usados para 1,0xFCS	Volumes usados par 1,5xFCS
NaCl (Sigma/Merck)	2,74 M	12,5 ml	18,75 ml
KCl (Merck)	0,06 M	12,5 ml	18,75 ml
CaCl ₂ (Merck)	0,05 M	12,5 ml	18,75 ml
MgCl ₂ (Merck)	0,03 M	12,5 ml	18,75 ml
NaHCO ₃ (Chemco)	0,0895 M	12,5 ml	18,75 ml
K ₂ HPO ₄ (Merck)	0,02 M	12,5 ml	18,75 ml
Na ₂ SO ₄ (Ecibra)	0,01 M	12,5 ml	18,75 ml
"Tris" (Nuclear/Merck)	0,4 M	31,25 ml	31,25 ml
HCl (Merck)	0,36 M	29 ml (pH 7,2)**	31,25 ml (pH 7,2)***
Volume final		250 ml	250 ml

* - (CH₂OH)₃CNH₂

-- 25 ml (pH=7,8) ; 27,5ml (pH=7,4); (27,5 ml p/ 25 ml Ca pH=7,5) e (28 ml p/ 25 ml P pH=7,5)

--- 26,5 ml (pH=7,8) ; 28ml (pH=7,4); (29 ml p/ 25 ml Ca pH=7,4) e (30 ml p/ 25 ml P pH=7,4)

4.4.1.3. Procedimento dos experimentos de calcificação *in vitro*

Os ensaios de calcificação foram realizados variando-se pH, concentração de Ca e P no FCS e as características do substrato de quitosana, conforme indicado:

a) *mudando-se pH da solução:*

a.1) pH 7,2

a.2) pH 7,4

a.3) pH 7,8

b) *mudando-se a relação Ca/P da solução:*

Soluções calcificantes com excesso de P ou Ca foram feitos, dobrando-se a quantidade dos respectivos sais (K₂HPO₄ ou CaCl₂), mostrados na tabela 4.4.1.2-B.

As soluções assim modificadas foram denominadas como solução P (com excesso de fosfato) ou Ca (com excesso de cálcio).

c) *mudando-se substrato:*

Utilizamos membranas de quitosana:

- densas (filme) e porosas;
- reticuladas com glutaraldeído e naturais;
- com ou sem PAA adsorvido.

Tivemos dois tipos de ensaio de calcificação realizados:

- 1) a longo prazo (até 1,5 mês) - utilizado para pH 7,2, somente com membranas com ou sem reticulação branda;
- 2) a curto prazo (1 semana) - utilizado para todos os pH's (7,2, 7,4 e 7,8), substratos (com glutaraldeído e PAA) e concentração de FCS com excesso de Ca e P.

A longo prazo:

Amostras densas e porosas, reticuladas e não reticuladas com glutaraldeído (2x2 cm²) foram colocadas em soluções FCS 1,0 (primeiros 3 dias) e FCS 1,5 (1,5 mês restante). Acredita-se que os primeiros dias sirvam para que as amostras sofram o mesmo processo de condicionamento que ocorre nos fluidos corpóreos reais. Nos dias posteriores, a concentração foi aumentada simplesmente para acelerar a deposição sobre a amostra já condicionada. Para que as amostras perdurassem tal período sem deterioração, estas foram submetidas a esterilização através de imersão em solução etanol:água 70:30 (vol/vol). A solução calcificante foi esterilizada por filtração através de filtro Millipore de 0,22µm de tamanho de poro. O conjunto de filtração, incluindo a membrana, foi autoclavado por 20 min a 125°C. Os frascos recipientes, seringas, agulhas e vidraria foram autoclavados a 130°C. Uma capela de fluxo laminar foi utilizada para todo o manuseio do material estéril. Foram colocados 80 ml de solução em cada frasco e recolhidos 70 ml da solução anterior para análise.

A curto prazo:

Amostras de quitosana (membranas) de aproximadamente 2x2 cm² de área foram imersas em 40ml de solução 1xFCS por 2 dias, em frascos de plástico, para que sofressem um processo inicial de indução similar à que sofreriam no plasma sanguíneo. Nos dias seguintes, trocava-se esta solução por outra recém preparada, de concentração 1,5xFCS (no segundo e quarto dia), para acelerarmos a mineralização. Os experimentos foram realizados a 36,5°C, durante um tempo total de 7 dias. Os pH's das soluções foram medidos antes e depois das trocas.

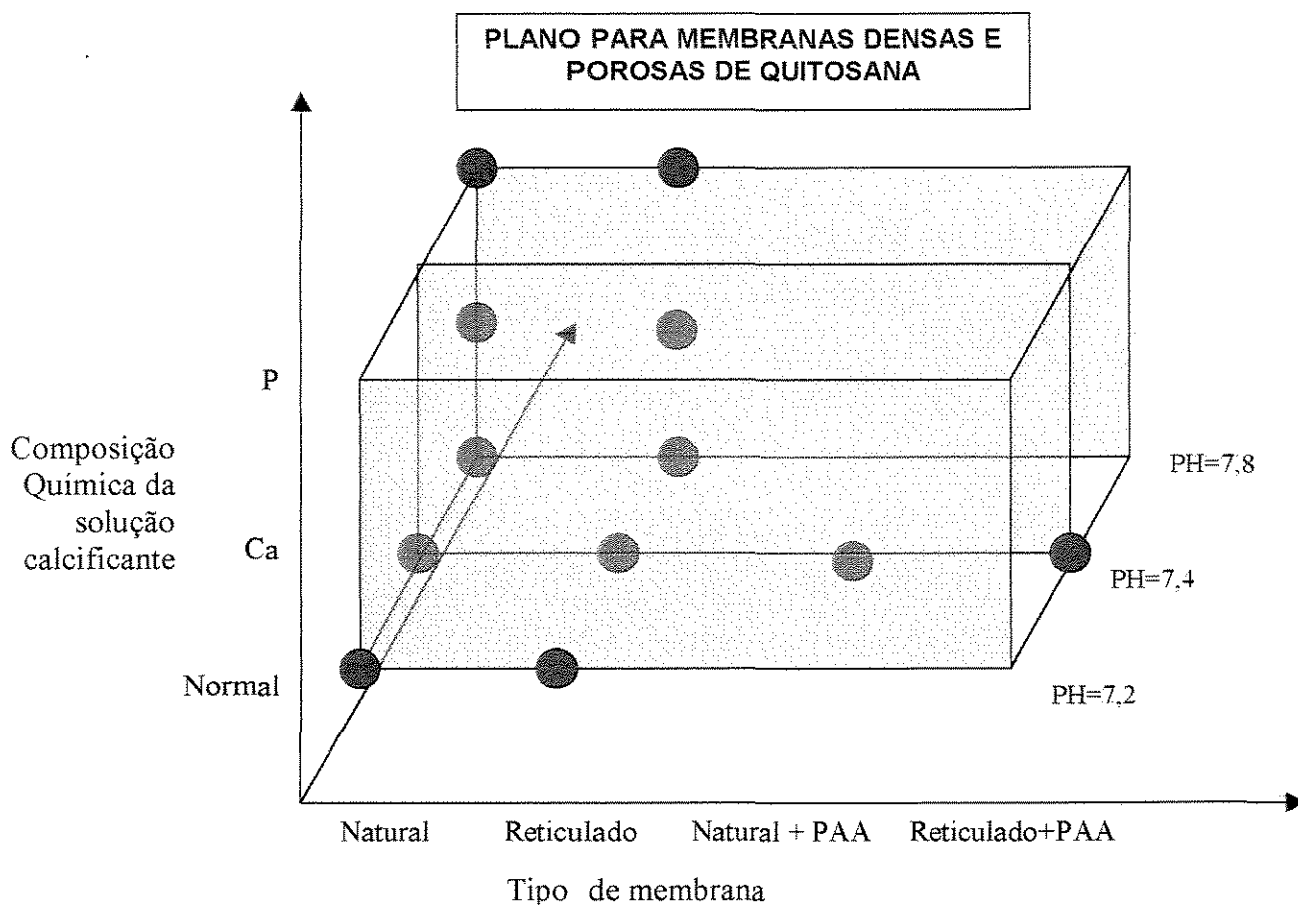


Figura 4.4.1.3-A: Plano para estudos de calcificação para membranas densas e porosas.

Utilizamos os banhos termostatizados Neslab Endocal RTE - 110 e Shaker Bath Lab/Line ORBIT e frascos de polipropileno autoclaváveis (Nalgon) de 125 ml de capacidade.

O uso de frascos autoclavados evitou a proliferação de microorganismos durante o experimento. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Para a observação da influência dos defeitos sobre a superfície do substrato na calcificação, rudimentarmente induzimos defeitos na superfície extremamente lisa de membranas densas de quitosana, tencionando e arrastando-se uma ponta de seringa de aço inox sobre as mesmas. Este ensaio foi realizado com FCS normais (sem excesso de P ou Ca) e a pH 7,8.

4.4.1.4. Acompanhamento do processo de calcificação

4.4.1.4.1. Análise elementar de Ca e P na solução

Análise de fósforo:

As determinações de fósforo nas soluções calcificantes foram feitas espectrofotometricamente empregando-se o método de azul de molibdênio (Dee e Ettre, 1973). Este método baseia-se na medida da absorbância num comprimento de onda de 825nm do complexo de coloração azul, formado pela reação entre fosfato e molibdato, na presença de um agente redutor (ácido ascórbico).

Toda vidraria utilizada foi lavada com detergente livre de fosfato para que não houvesse interferências na análise. Água ultra-pura milli-Q foi utilizada como solvente.

As determinações de fósforo foram feitas em triplicata misturando-se:

- 100 µl da solução problema (calcificante);
- 4500 µl de água (Milli-Q);
- 500 µl de solução 2% (massa) de $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ (Merck);
- 500 µl de solução 8% (massa) de 1-ácido ascórbico (Merck), recém-preparado,

num tubo de ensaio que foi agitado e mantido por 30 min. Foram, então, realizadas as leituras no espectrofotômetro Hitachi U-2000. As leituras de absorbância foram realizadas e convertidas em mg de fósforo usando-se uma curva padrão a partir de soluções padrões.

A preparação de padrões foi feita seguindo-se a receita para 1,5xFCS, mas adicionando-se mais ou menos solução de CaCl_2 e K_2HPO_4 , de modo a se obter soluções com concentração de P e Ca com 2,0; 1,5; 1,0; 0,7; 0,5 e 0 vezes a concentração do FSC. Todas as soluções-problema e padrões foram estocadas em frascos de polietileno, à temperatura de 4°C.

Análise de Cálcio:

O cálcio das soluções de calcificação foi determinado fluorometricamente (Kepner e Hercules, 1963; V. Hattinberg et alli, 1966). Foi utilizado um método baseado na formação de um quelato fluorescente entre o cálcio e a Calceína em uma solução fortemente alcalina. Este método não sofre interferência do íon magnésio, ou de proteínas.

A água utilizada era ultra-pura, livre de íons cálcio. O procedimento foi adicionar:

- 1000 µl de KOH (Merck) 0,4N (2,2444g para 100ml de solução);
- 100 µl da solução problema diluído (100 µl/2,5 ml) ;

- 200 μ l de solução de Calceína (Merck) (60 mg/l);
- 4000 μ l de água (Milli-Q).

Utilizamos o equipamento Fluorescence Spectrophotometer F-4500 da Hitachi. As medidas foram realizadas num comprimento de onda de excitação de 436 nm e num comprimento de onda de emissão de 516 nm, onde se observava um máximo de emissão conforme a varredura feita nos comprimentos de onda de emissão de 400 a 600 conforme a figura 4.4.1.4.1-A.

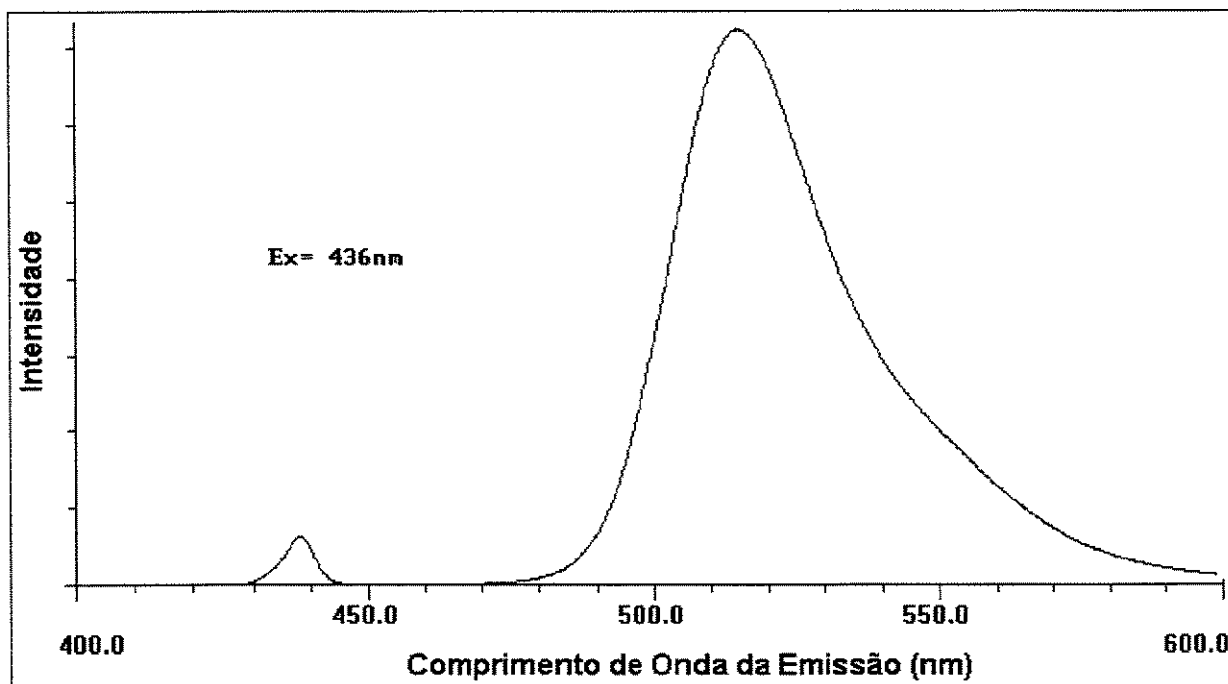


Figura 4.4.1.4.1-A: Varredura de emissão x excitação de fluorescência do complexo de cálcio e calceína.

O método é estável, pois o pico não sofre deslocamento significativo com a concentração. No entanto, as leituras devem se concentrar num intervalo de tempo fixo após a adição de calceína, já que sua solução e o quelato formado não são estáveis à presença de luz. Em nosso caso, limitamo-nos à leitura entre 3 e 5 minutos após a adição dos componentes do teste.

As leituras, feitas em triplicata, também foram convertidas a mg de cálcio de acordo com uma curva padrão obtida utilizando-se os mesmos padrões da análise de fósforo.

4.4.1.4.2. Medidas de pH

Os pH's das soluções eram medidos periodicamente (antes e após cada troca) usando-se o pHmetro Mettler Delta 340, com eletrodo INGOLD InLab M404/ pH NT (80 k Ω), periodicamente calibrado com soluções padrões de pH 4,0 e 7,0.

4.4.1.5. Avaliação da calcificação ocorrida na quitosana

4.4.1.5.1. Espectroscopia de IV

Espectros IV das membranas densas antes e depois da calcificação (após lavagem e secagem ao ar) foram obtidas na faixa de 4000-650 cm⁻¹ utilizando-se o instrumento FTIR da Nicolet Protégé 460, com o acessório ATR (reflexão total atenuada) de ZnSe.

4.4.1.5.2. Difratometria de RX

O espalhamento de raios-X é uma das técnicas mais antigas e mais usadas no estudo da estrutura dos polímeros. Um feixe de raios-X incidente pode ser parcialmente absorvido, espalhado e/ou transmitido sem modificação. O fenômeno de espalhamento, por sua vez, ocorre como um resultado da interação com os elétrons do material. Os raios-X espalhados sofrem interferência entre si produzindo um padrão de difração que varia com o ângulo de espalhamento. A variação da intensidade espalhada e difratada com o ângulo dá informações sobre a distribuição de intensidade eletrônica e, portanto, das posições atômicas dentro do material.

Existem várias técnicas que usam esse princípio, mas as mais conhecidas são o espalhamento de raios-X de ângulo largo (WAXS - wide-angle X-ray scattering) e o espalhamento de raios-X de ângulo pequeno (SAXS - small-angle X-ray scattering). O primeiro é usado para obter informações na escala de 1 nm ou menor e o segundo, na escala de 1-1000 nm.

Os fosfatos de cálcio representam uma classe extremamente vasta de minerais, orgânicos ou não, com inúmeras possibilidades de hábitos cristalinos disponíveis dependendo da composição e das condições nas quais foi sintetizado.

Em sistemas orgânicos, é muito raro encontrar-se fosfatos de cálcio cristalinos, sendo mais comum a existência de materiais mais amorfos ou pouco cristalinos, simplesmente denominados como apatitas.

O padrão de espalhamento de polímeros e materiais amorfos é de picos alargados (halos) capazes, mesmo assim, de informar sobre o estado de empacotamento das moléculas no interior do material. Vários exemplos de caracterização de amorfos através de RX são disponíveis na literatura, preponderantemente na área de polímeros e vidros.

A relação de Bragg, $d = \lambda / 2 \cdot \sin \theta$, onde λ é o comprimento de onda da radiação e θ o ângulo de máxima intensidade de espalhamento, pode ser utilizada como uma boa regra para estimar-se a escala de d da estrutura responsável pelo espalhamento.

Em polímeros não cristalinos, o espaçamento médio molecular entre as cadeias $\langle R \rangle$ em ângstrons é calculado a partir do máximo mais intenso através da equação:

$$\langle R \rangle = 5 \cdot \lambda / 8 \cdot \sin \theta$$

A largura à meia altura HW da banda de maior intensidade é usada para descrever a distribuição do espaçamento médio entre as cadeias.

Os máximos num difratograma de WAXS (wide-angle X-ray scattering) decrevem distâncias menores que 4 ângstrons, que surgem de distâncias intramoleculares, como as distâncias de carbonos conectados por ligações covalentes. Os picos a distâncias maiores, surgem tanto de efeitos intra como inter moleculares. A discriminação entre eles é melhor realizada em amostras altamente orientadas, onde o espalhamento de picos devido a pares intermoleculares tende a se localizar no equador enquanto as intramoleculares, mais ao longo do meridiano.

Utilizamos o equipamento X'Pert PW3050 da Philips, do Laboratório de Calibração e Recursos Analíticos FEQ/Unicamp, com a condição de 40 kV, radiação de Cu- α ($\lambda = 1,5406 \cdot 10^{-10} \text{m}$) e grau 2 θ . Utilizamos o software PC-APD versão 4.0 e MS Origin 5.0 para analisar os espectros. As amostras foram preparadas para análise (lavadas e liofilizadas) sobre um suporte metálico.

4.4.1.5.3. Outras análises

Como já descrito nos capítulos anteriores, a análise morfológica dos filmes foi feita usando-se microscopia eletrônica de varredura (MEV). Utilizamos o microscópio JEOL JXA-840A Electron Probe Microanalyzer¹. A quantificação de fósforo e cálcio pôde ser feita microscópica e localizadamente através de espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDS). As amostras foram observadas após lavadas com água Milli-Q, liofilizadas, fraturadas a frio e cobertas com carbono por evaporação. Também foi

¹ gentilmente cedido pela Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM/ Unicamp).

realizada titulação potenciométrica dos materiais calcificados e ATG conforme descrito na seção 4.2.1.1.

O próximo item do trabalho, adsorção de proteínas, poderia também ser classificado como um outro tipo de análise das calcificações obtidas sobre a quitosana, porém, devido à especificidade do tema, será tratado como um item separado.

4.5. Ensaio de adsorção de proteína em quitosana calcificada

Foram utilizados como adsorventes, membranas porosas, sem calcificação, de quitosana natural (N), reticulada (NR), natural com PAA (NPAA); e também membranas calcificadas: calcificada com PAA (PAA), calcificada a pH 7,8 (7,8) , calcificada a [Ca] alta (Ca) e calcificada a concentração de [P] alto (P).

Foram utilizadas como proteínas-modelos: BSA (pI ~4,7), Citocromo C (pI ~9,8-10,6) e Inibidor de tripsina de soja (pI ~4,5) fornecidos pela Sigma.

4.5.1. Adsorção Protéica Comparativa por Tanque Agitado

Como comparação inicial, utilizamos Inibidor de tripsina (IT), BSA e citocromo C, diluída em solução tampão TRIS 500 mM pH=7,5 com água ultrapura (milli-Q), para estimar a adsorção entre a matriz de quitosana pura e calcificada.

Foram pesadas quantidades fixas de resina úmida das matrizes de quitosana e, após o condicionamento no mesmo tampão, colocadas em contato com as soluções protéicas em tubos de microensaio “eppendorfs” (1ml), mantidos sob agitação constante a 10 rpm 25°C por um período de 24 horas.

As concentrações utilizadas e os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 5.3.1.

4.5.2. Isoterma de equilíbrio de adsorção

As isotermas de equilíbrio das proteínas em diversos adsorventes foram obtidas, utilizando-se de ensaios por bateladas. As quantidades fixas dos adsorventes, previamente condicionados no mesmo tampão Tris-HCl 500 mM pH 7,5 foram colocados em microtubos (1,5 ml) (evitando-se o uso de tampão fosfato que interfeririam nos ensaios) e adicionando-se a seguir as soluções das proteínas com diferentes concentrações iniciais.

Os tubos foram mantidos sob agitação constante a 10 rpm à 25°C por 24 horas, ao final do qual determinou-se a concentração da proteína no sobrenadante por medidas de absorvância no UV. A análise pela diferença de concentração de proteína forneceu dados para a construção das isotermas de equilíbrio; onde pode-se expressar a capacidade do adsorvente em miligramas de proteína por grama de adsorvente em função da concentração de equilíbrio da proteína no sobrenadante em miligramas de proteína por mililitro de solução.

Na sequência, após uma centrifugação a 10.000 rpm e rápida lavagem do adsorvente por tampão, foram adicionadas um mesmo volume de solução tampão com 1,0 M em NaCl (nas quitosanas não calcificadas) para se promover a dessorção das proteínas cuja interação foram preponderantemente eletrostáticas. Após a adição de 1,0 M de NaCl, os sistemas foram deixados sob as mesmas condições por mais 24 horas.

Os gráficos da seção 5.6 mostram os resultados comparativos entre citocromo C e albumina de soro bovino (BSA). Todos os ensaios foram realizados sempre em duplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese das membranas de quitosana

As membranas densas mostraram-se mais resistentes mecanicamente do que as porosas. Morfologicamente, as membranas porosas eram opacas devido ao espalhamento de luz obtido pela existência dos poros microscópicos.

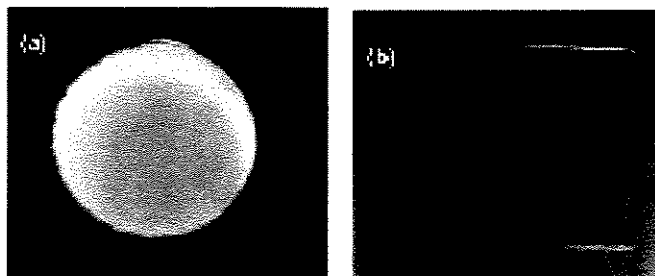


Figura 5.1-A: Aspecto macroscópico de membranas porosas (a) e densas (b) de quitosana.

5.1.1. Espectroscopia de IV

Um espectro de IV-ATR típico de quitosana é mostrado na figura 5.1.1-A.

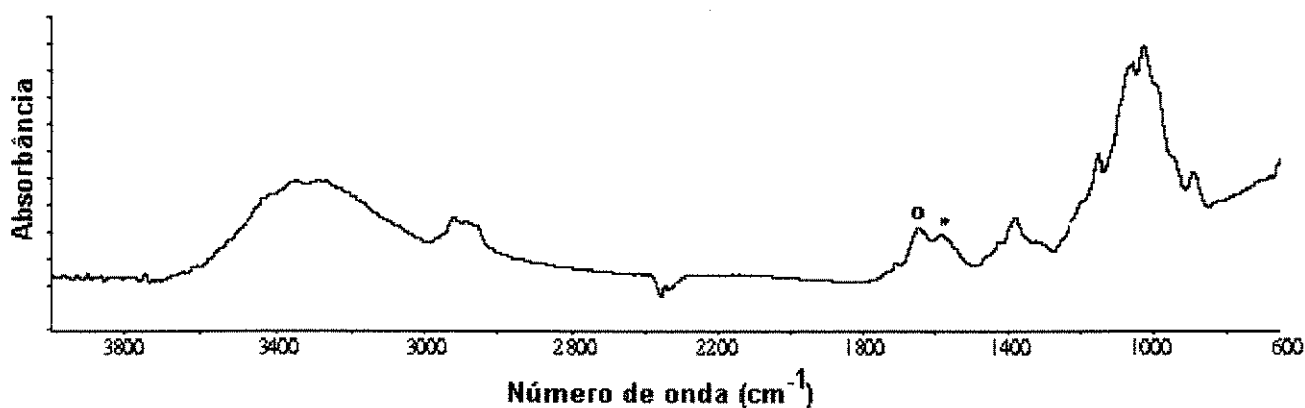


Figura 5.1.1-A: Espectro típico de IV da quitosana.

Pode-se observar na figura 5.1.1-A, as seguintes absorções (Zhang e Gonçalves, 1995):

- 1068 cm^{-1} - estiramento vibracional C-O de álcool primário (1090 cm^{-1} - grupo éter);
- $1070\text{ a }1100\text{ cm}^{-1}$ - aminas alifáticas;

- 1600 cm^{-1} - aminas (N-H);
- 1700 cm^{-1} - COOH (C=O);
- $1600\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$ - amida;
- 1654 cm^{-1} e 1380 cm^{-1} - vibração de deformação de intensidade média N-H de amina primária e de intensidade pequena C-H do grupo CH_3 referente ao grupo acetamido (ainda possivelmente presente em pequena proporção, pois a quitosana ainda não é completamente desacetilada) (Kimura et alii, 1999);
- 1550 cm^{-1} - sobreposição de aminas, amida e ânion carboxilato;
- 1400 cm^{-1} - grupos alquís e carboxilatos (O-C-O);
- 1450 cm^{-1} - grupo alquil (CH);
- $1725\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$ e $1230\text{-}1277\text{ cm}^{-1}$ - grupos ésteres;
- 2900 cm^{-1} - estiramento C-H;
- região de 3400 cm^{-1} - presença de hidroxilas (estiramento OH).

5.1.2. Conteúdo de n-acetila

O grau de desacetilação da quitosana foi determinada através de curvas de titulação potenciométrica.

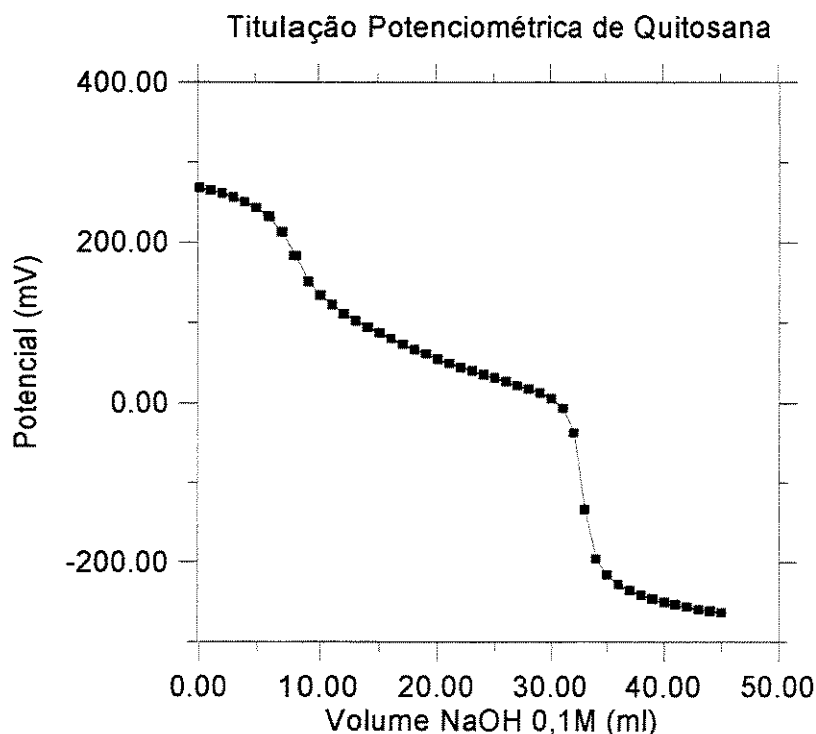


Figura 5.1.2-A: Curva típica de titulação potenciométrica de quitosana natural.

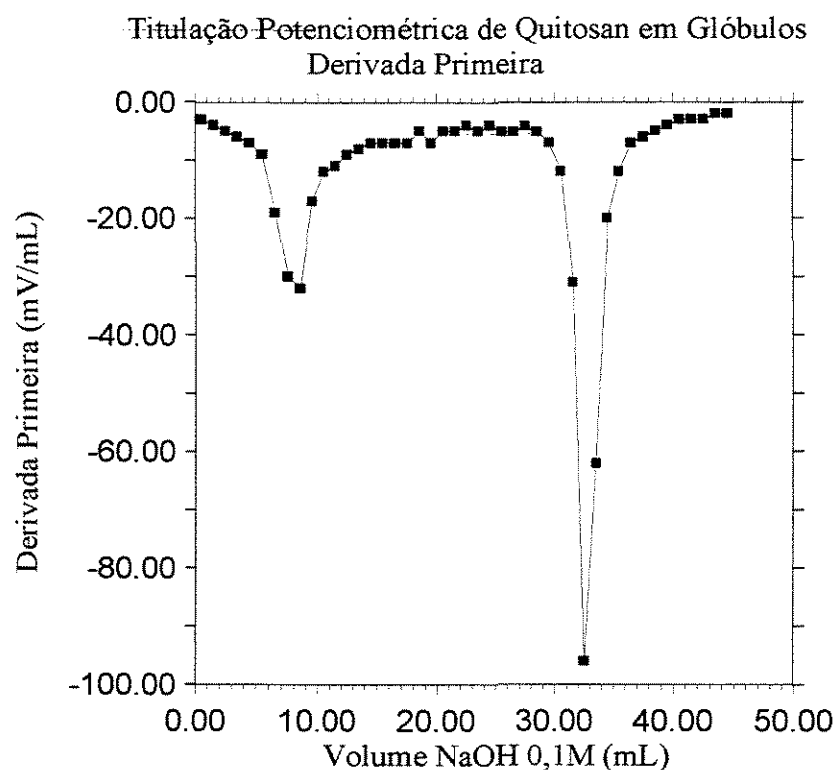


Figura 5.1.2-B: Derivada primeira da figura 5.2.1-A.

Através da figura 5.1.2-B notamos que, tendo-se os valores da massa de quitosana, $[HCl] = 0,02N$ e $[NaOH] = 0,1N$, podemos obter o conteúdo de grupos n-acetila.

Tabela 5.1.2-A: Conteúdo de n-acetila da quitosana, segundo ensaios de titulação potenciométrica.

mMoles de Quitosana (base seca)	Concentração de solução de HCl utilizada para protonação (mol/l)	Concentração de solução de NaOH utilizada para neutralização (mol/l)	Vol solução de (ml)	Moles de NaOH usados na titulação	% molar de desacetilação da quitosana
1,96	0,02	0,1	17,25	1,67	85,2
2,71	0,02	0,1	24,35	2,35	86,9

Dessa forma, podemos concluir que neste trabalho, lidamos com quitosana 86% desacetilada, em média.

5.1.3. Peso molecular da quitosana estudada

Através dos pontos experimentais obtidos, foram ajustadas as seguintes curvas para η_{esp} e η_{iner} :

$$\eta_{\text{iner}} = 159,085 - 22643,3 * \text{Concentração} \quad r^2=0,997$$

$$\eta_{\text{esp}} = 182,033 - 26093,3 * \text{concentração} \quad r^2=0,997$$

De onde se tira que $M_{\text{quitosana}} \approx 65.000$

Ou seja, tendo a unidade de quitosana (monômero) um peso molecular de 161, temos que, em média, as moléculas da quitosana utilizada têm cerca de 405 unidades monoméricas.

5.1.4. Morfologia

MEV: A morfologia observada das membranas densas e porosas de quitosana foram observadas por MEV. As membranas densas mostram-se como superfícies muito planas, o que nos levou à possibilidade de observá-las por microscopia de força atômica. Já as amostras porosas são apresentadas na figura 5.1.4-A. Como pode-se notar, a morfologia da superfície porosa natural mostra-se facilmente colapsável ao ar ambiente, quando liofilizada, pois absorve muita água. Uma maneira contornável para observarmos tais estruturas foi reticular estas amostras com glutaraldeído 0,25% por uma noite à temperatura ambiente. Dessa forma, as estruturas liofilizadas mostram-se auto-sustentáveis durante o manuseio ao ambiente com umidade. Segundo a figura 5.1.4-A, os poros dependem da concentração de NaOH no meio coagulante. Quanto maior a concentração, mais violenta a neutralização, o que induz a formação de poros maiores. Também nota-se que as membranas são assimétricas, pois mostram morfologia porosa diferente do lado do vidro e do lado do ar.

AFM: As Figuras 5.1.4-B e 5.1.4-C mostram como a quitosana é capaz de formar estruturas consideradas muito planas. As estruturas superficiais observadas são granulares da ordem de centenas de nanômetros de diâmetro/altura, o que pode indicar espécies de esferulitos de quitosana, considerando-se que uma molécula de quitosana também possui uma capacidade muito grande de auto-organização (capaz de formar fibras e redes em sistemas orgânicos).

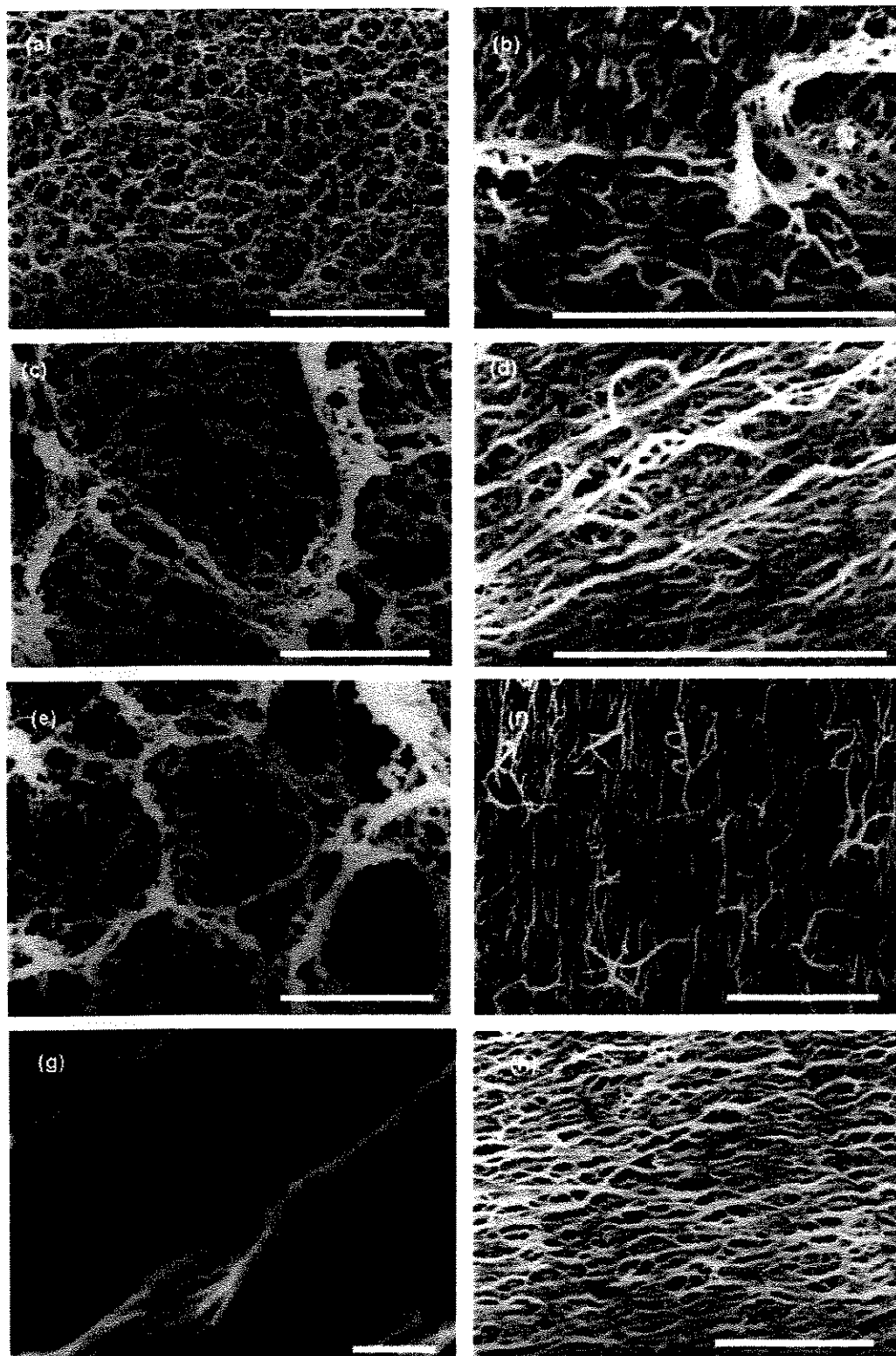
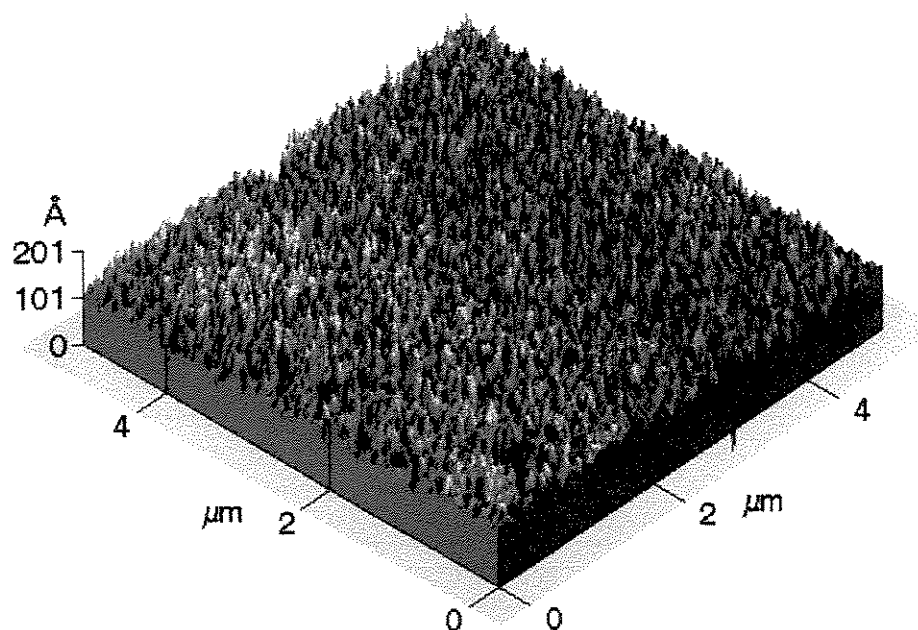


Figura 5.1.4-A: Micrografia eletrônica de varredura de membranas porosas naturais (g) e reticuladas (todas as demais): (a) tratada a 0,125M NaOH lado do vidro (b) lado do ar; (c) com 0,25M NaOH lado do vidro e (d) lado do ar; com 0,5M NaOH lado do vidro (e) e lado do ar (f); e (h) 1,0 M lado do ar. As barras correspondem a 10μm.

(a)



(b)

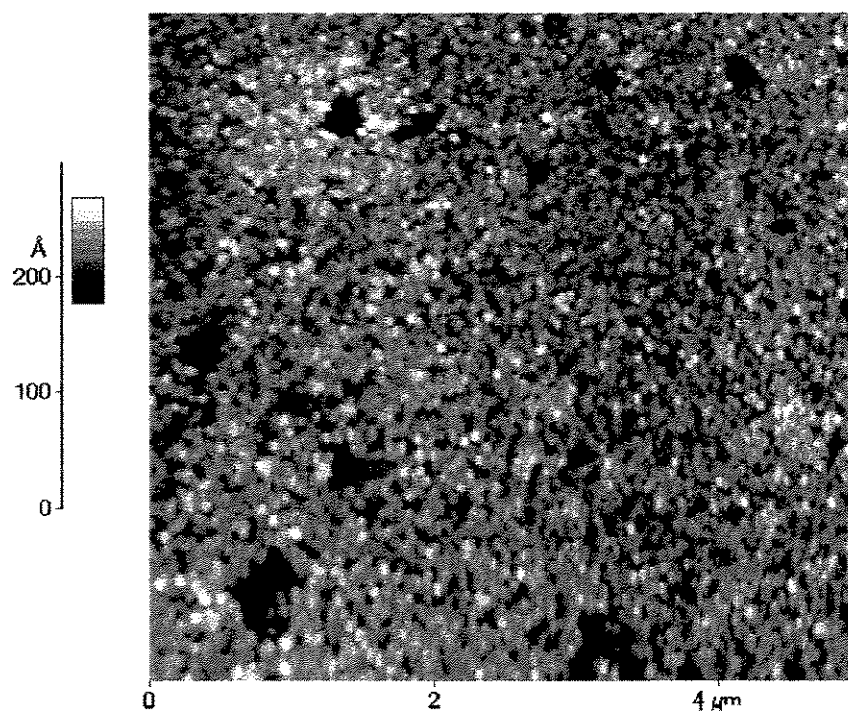
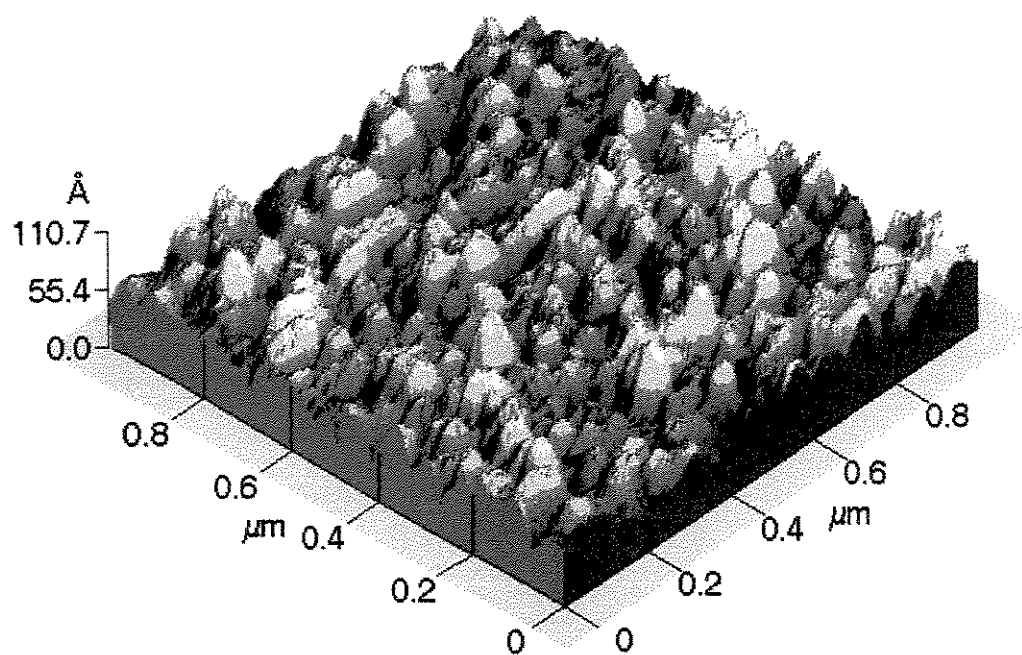


Figura 5.1.4-B: Microscopia de força atômica mostrando topografia de membrana densa de quitosana ($5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ de área). (a) figura tridimensional e (b) figura plana correspondente a (a).

(a)



(b)

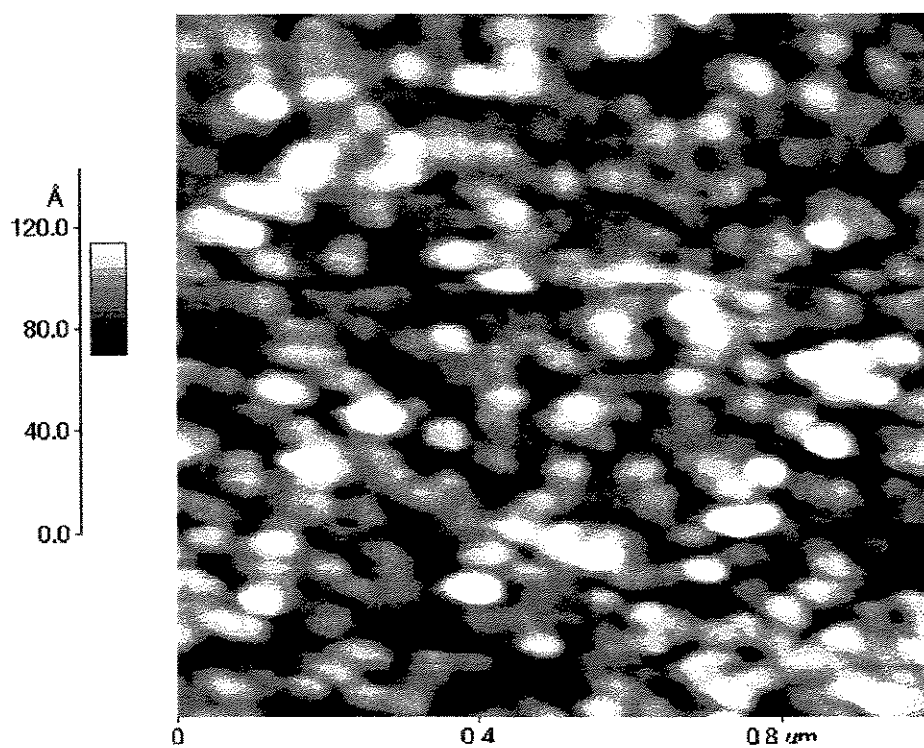


Figura 5.1.4-C: Microscopia de força atômica mostrando topografia de membrana densa de quitosana ($1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ de área). (a) figura tridimensional e (b) figura plana correspondente a (a).

5.2. Reticulação das membranas de quitosana com glutaraldeído

5.2.1. Plano fatorial

As influências de concentração, temperatura e tempo de reação (sobre o grau de reticulação resultante na quitosana), foram medidas e são mostradas nas figuras 5.2.1-A e 5.2.1-B. Os efeitos dos fatores estão mostrados nas tabelas 5.2.1-A e 5.2.1-B.

Tabela 5.2.1-A: Efeitos dos fatores (sobre a intensidade relativa do pico a 1077 cm^{-1} e absorção de água) e suas interações, em valores não normalizados.

Termo	Intensidade relativa do pico 1077	Absorção de H_2O (%)
Constante	0,41681	67,563
Concentração	-0,10345	-0,92198
Tempo	-0,01229	-0,08535
Temperatura	0,00156	0,18179
ConcentraçãoXTempo	-0,00290	-1,21972
ConcentraçãoXTemperatura	-0,01105	-0,91177
TempoXTemperatura	-0,00028	-0,02660
ConcentraçãoXTempoXTemperatura	0,00100	0,10940

Tabela 5.2.1-B: Efeitos dos fatores (sobre a intensidade relativa do pico a 1077 cm^{-1} e absorção de água) e suas interações, em valores normalizados.

Termo	Intensidade relativa do pico 1077	Absorção de H_2O (%)
Constante	$0,306 \pm 0,009$	$64,4 \pm 0,28$
Concentração	$-0,025 \pm 0,009$	$-1,83 \pm 0,29$
Tempo	$-0,037 \pm 0,009$	$-1,19 \pm 0,29$
Temperatura	$-0,013 \pm 0,009$	$-0,42 \pm 0,28$
ConcentraçãoXTempo	$0,008 \pm 0,009$	$0,07 \pm 0,29$
ConcentraçãoXTemperatura	$-0,007 \pm 0,009$	$-0,42 \pm 0,29$
TempoXTemperatura	$-0,0001 \pm 0,009$	$0,09 \pm 0,29$
ConcentraçãoXTempoXTemperatura	$0,004 \pm 0,009$	$0,47 \pm 0,29$

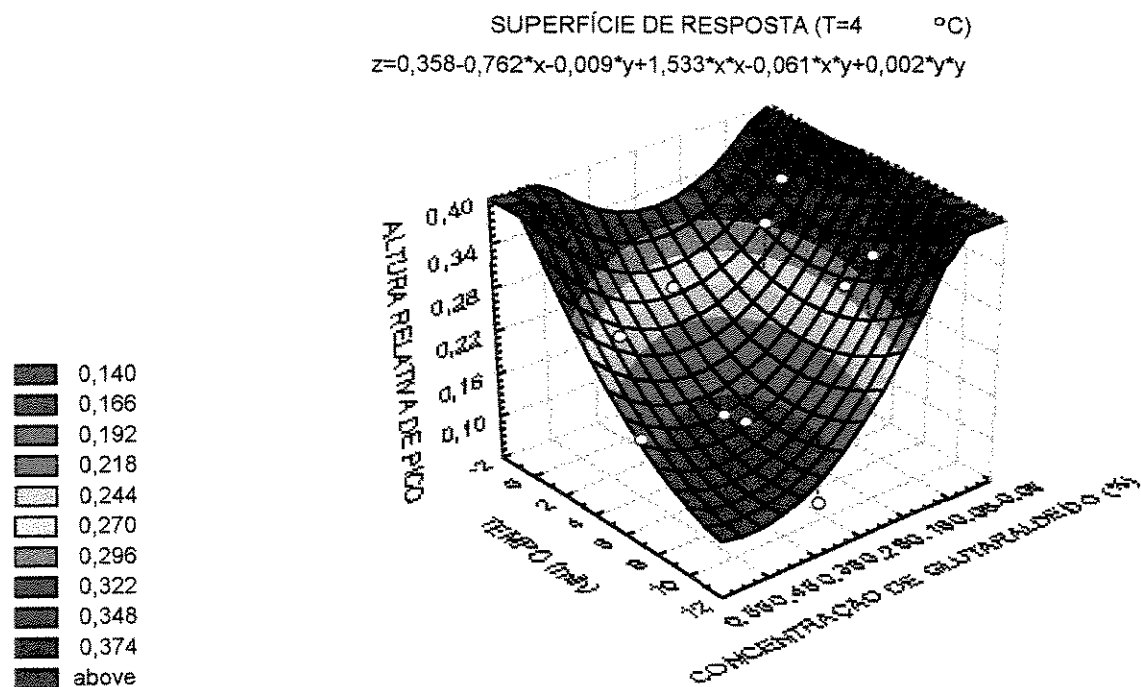
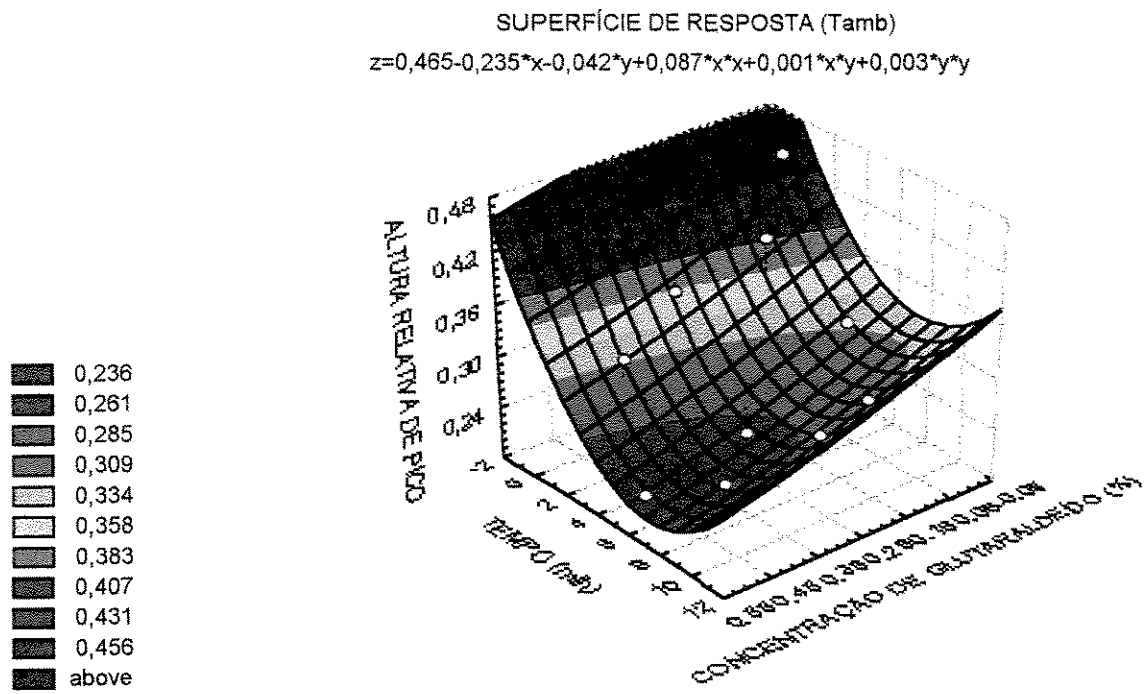


Figura 5.2.1-A: Superfície de resposta de altura relativa de pico ($1077 \text{ cm}^{-1} / 1636 \text{ cm}^{-1}$) versus concentração e tempo para a reticulação com glutaraldeído. $T=21^\circ\text{C}$ (alto) e $T=4^\circ\text{C}$ (baixo).

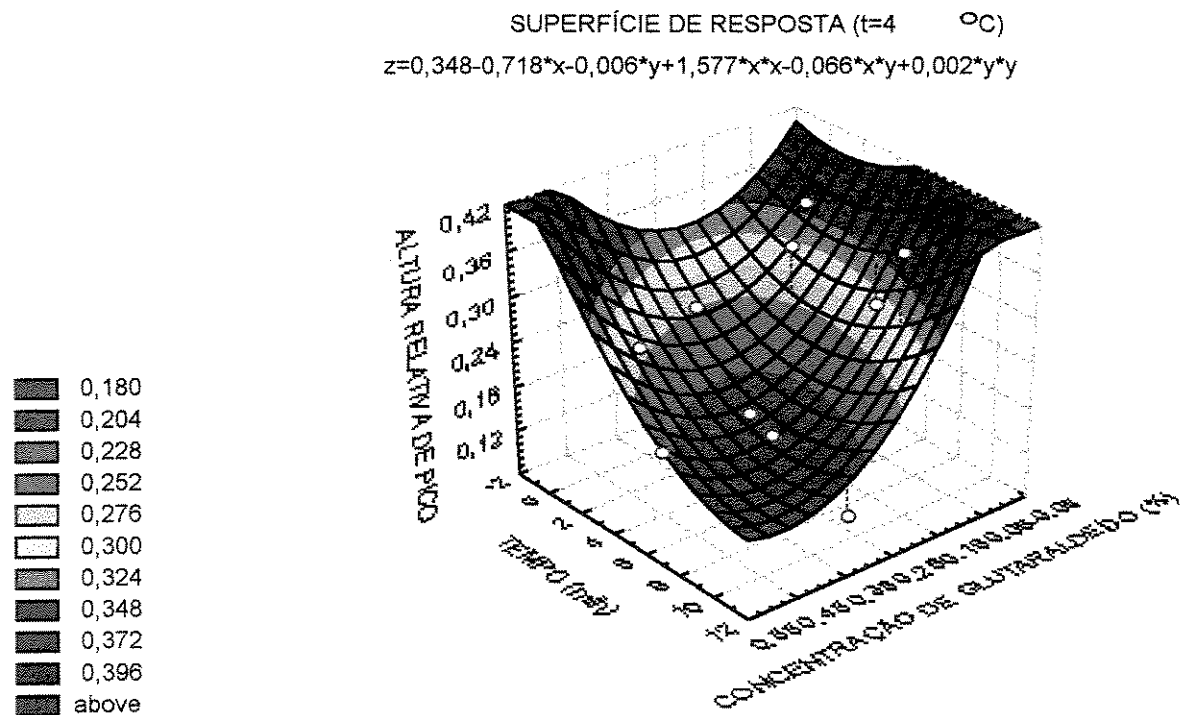
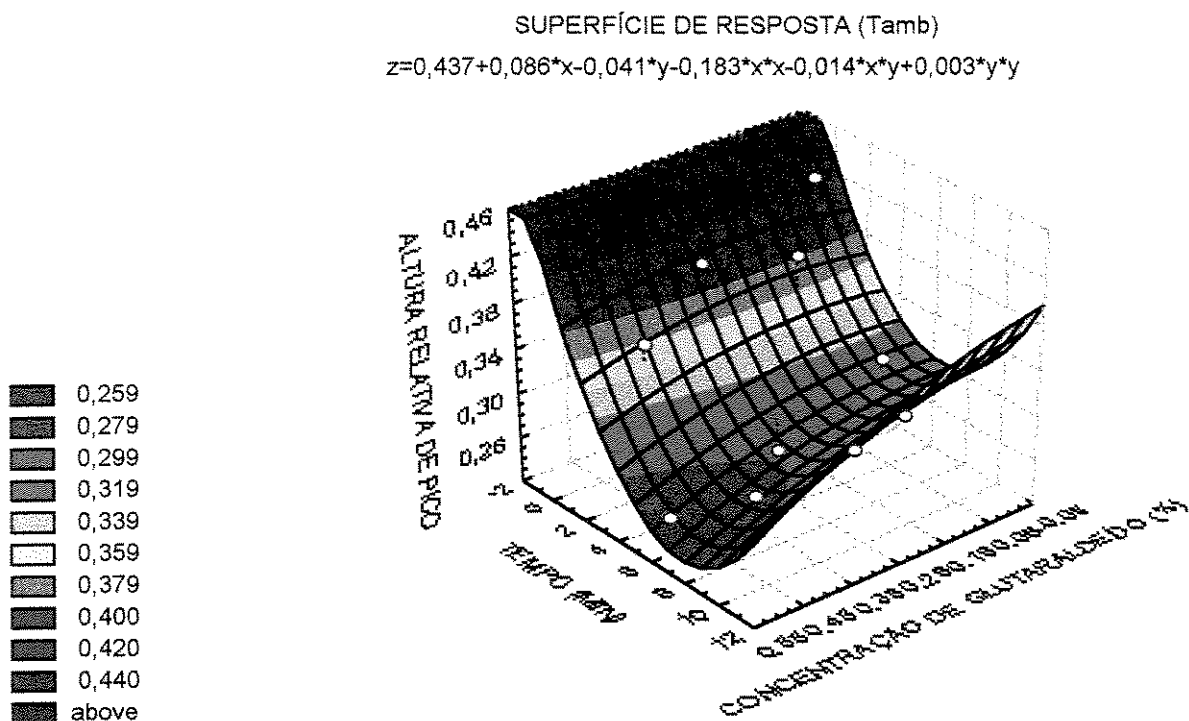


Figura 5.2.1-B: Superfície de resposta de altura relativa de pico ($1031\text{ cm}^{-1}/1636\text{ cm}^{-1}$) versus concentração e tempo para a reticulação com glutaraldeído. $T=21^{\circ}\text{C}$ (alto) e $T=4^{\circ}\text{C}$ (baixo).

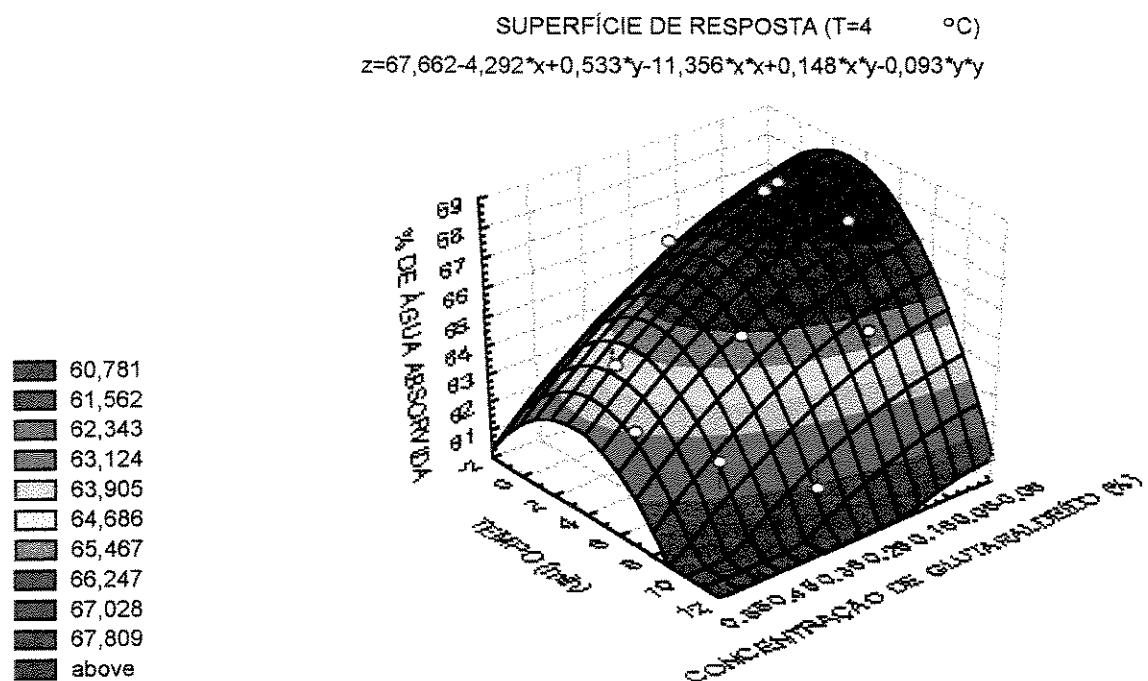
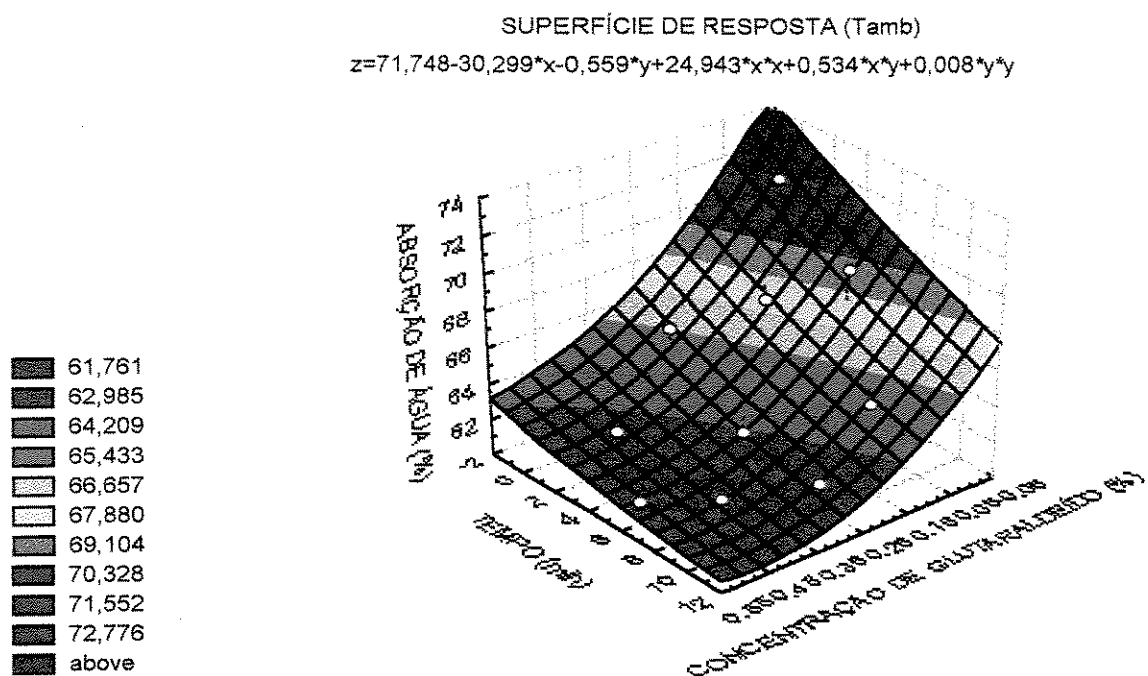


Figura 5.2.1-C: Superfície de resposta de absorção de água (% mássica) versus concentração e tempo para a reticulação com glutaraldeído. T=21°C (alto) e T=4°C (baixo).

O ajuste com o pico de 1031 cm^{-1} não se mostrou muito bom, r^2 foi de 0,4 enquanto o para o pico 1077 cm^{-1} foi 0,8 e para absorção de água foi 0,9. Esses valores de r^2 se justificam se lembramos que a metodologia de quantificação de grupos amino livres por infra-vermelho é uma técnica muito susceptível a erros externos. Os erros com pesagem foram menores, os quais induzem melhor ajuste do modelo polinomial. Mesmo assim, foi possível através dos dados de IR (os dados com absorbância da solução de glutaraldeído não apresentaram-se muito diferentes na condição inicial e final, ou seja, não foram um parâmetro sensível o suficiente para o estudo em questão) notar-se a influência dos fatores: concentração de glutaraldeído, tempo de reticulação e temperatura. Experimentalmente pôde-se notar que a reticulação com glutaraldeído é um processo extremamente delicado. E somente os efeitos principais são bem pronunciados. Os efeitos interativos não foram, na faixa estudada, consideráveis frente aos erros de ajuste observados.

5.2.2. Morfologia das membranas reticuladas

MEV:

Conforme vistas na seção 5.1, as amostras reticuladas com glutaraldeído mostram-se mais resistentes à umidade do meio ambiente. Na figura 5.2.2-A observa-se a morfologia da membrana porosa reticulada com glutaraldeído a ser utilizada para os ensaios de calcificação.

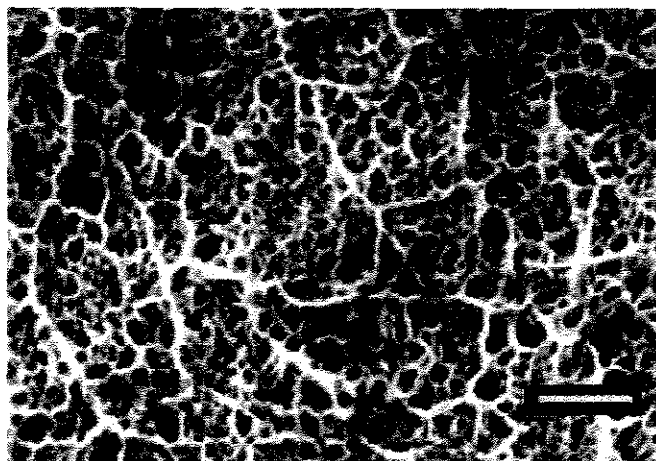
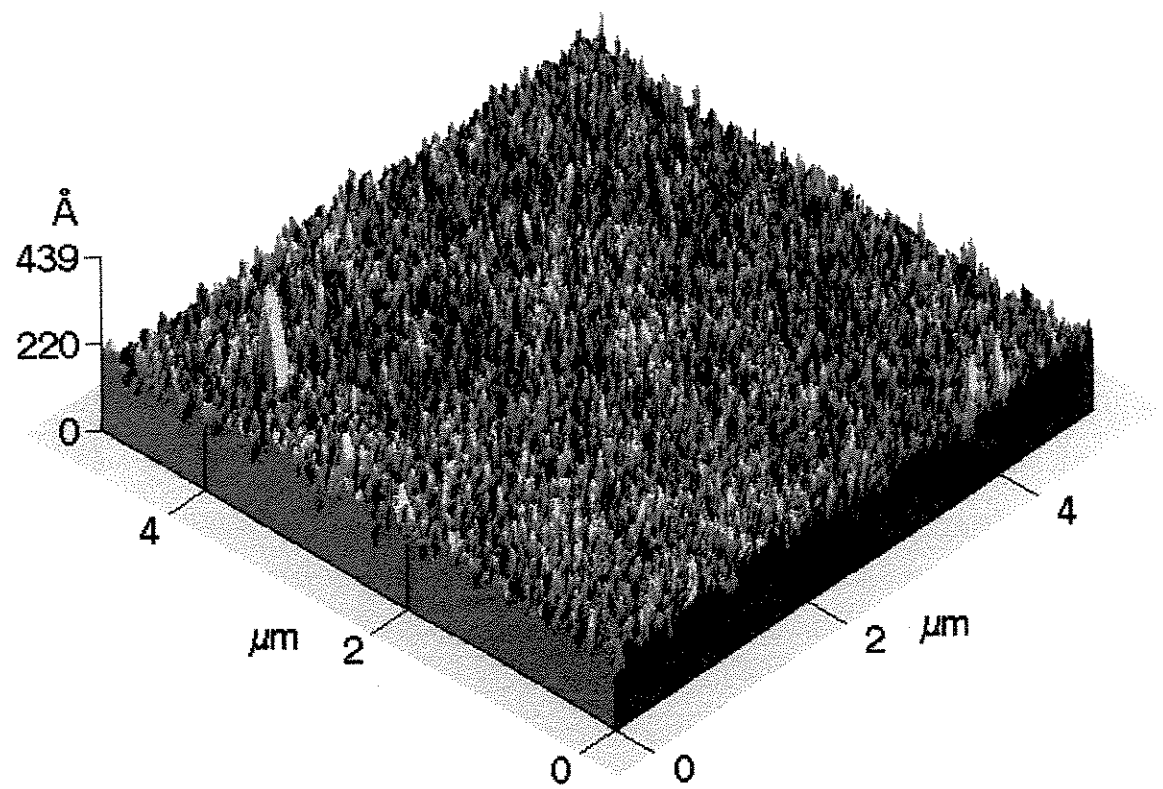


Figura 5.2.2-A: Morfologia da membrana porosa de quitosana reticulada a ser utilizada nos ensaios de calcificação. Barra = $10\mu\text{m}$.

(a)



(b)

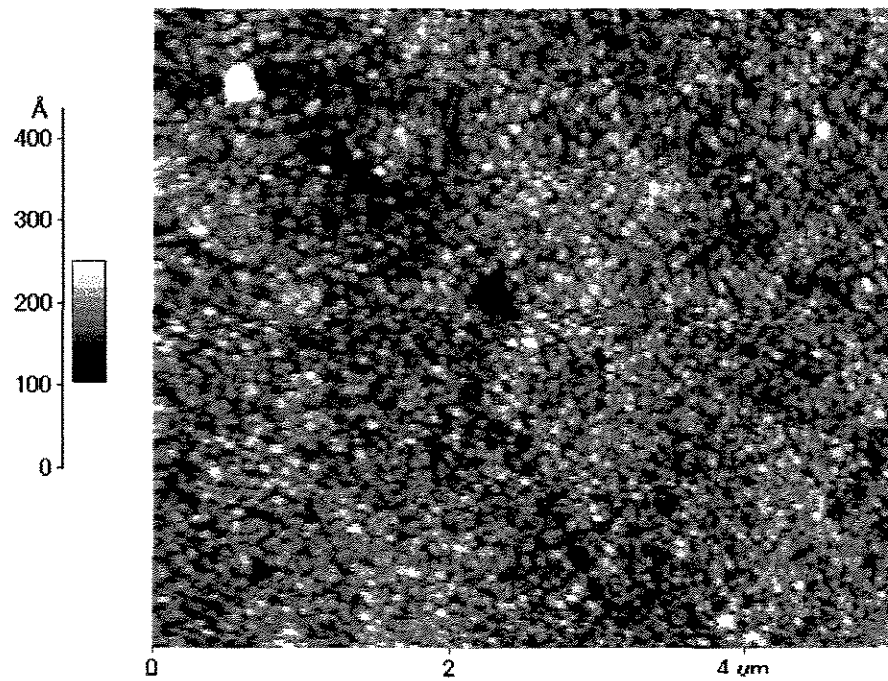


Figura 5.2.2-B: Micrografia de força atômica de filme (membrana densa) reticulada de quitosana (5μm x5μm).

MFA:

Pode-se observar a morfologia da membrana densa reticulada com glutaraldeído. Nota-se, comparativamente com a imagem obtida para amostra densa natural (item 5.1.4), que a reticulada é mais sensível ao cantilever, já que há uma marcação observada no sentido da varredura. Esse tipo de fenômeno é comum em polímeros cuja densidade de cargas superficial é muito sensível, ou em que a estrutura é modificável mecanicamente. Vale lembrar que as amostras naturais são mais resistentes enquanto que as reticuladas são mais quebradiças e têm pouca resistência mecânica.

5.2.3. Análise termogravimétrica

Na figura 5.2.3-A e B nota-se como a quitosana perde massa ao ser aquecida.

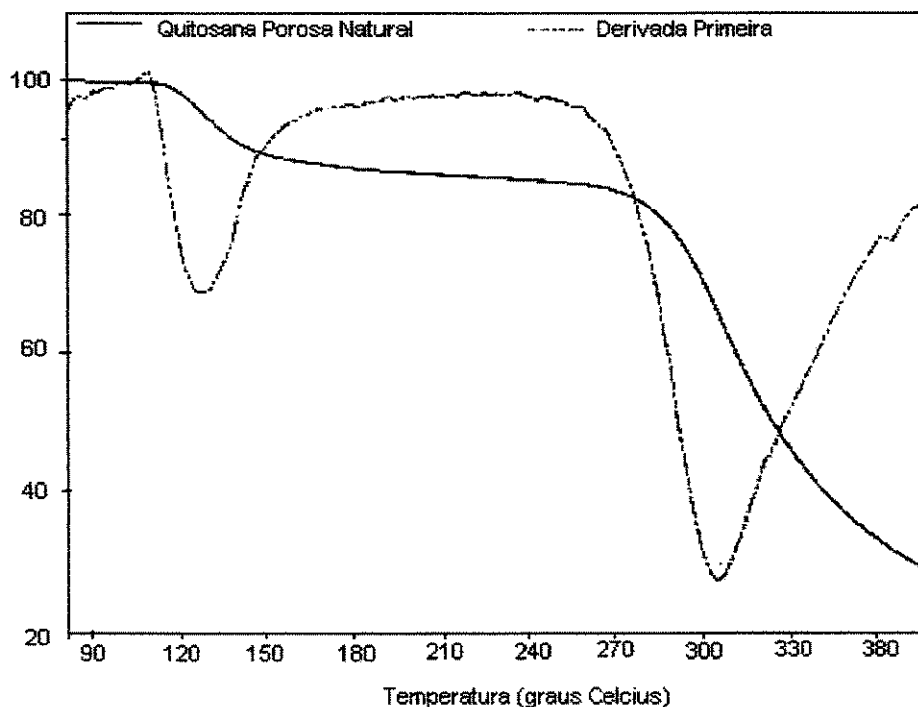


Figura 5.2.3-A: Análises termogravimétricas de membrana porosa de quitosana natural.

Pode-se notar que a amostra reticulada tende a reter menos água, que acaba volatilizando-se muito mais facilmente que na membrana natural, devido à menor afinidade entre as moléculas de água e a matriz. Isto mostra que os grupos amino, hidrofílicos, estão realmente mais bloqueados na membrana com glutaraldeído.

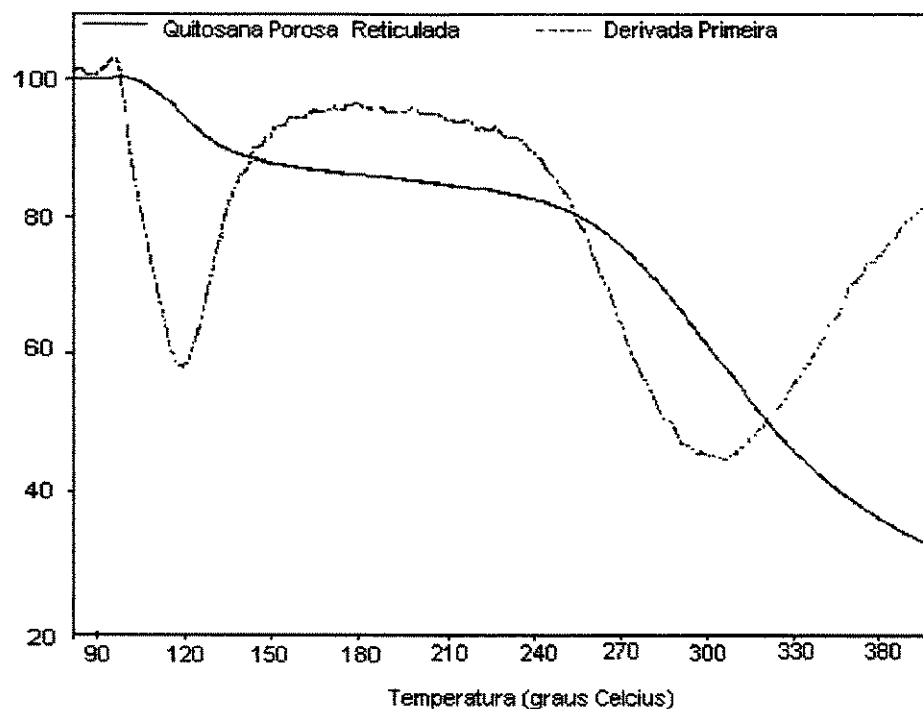


Figura 5.2.3-B: Análises termogravimétricas de membrana porosa de quitosana reticulada.

5.2.4. Espectroscopia de Infravermelho

Nota-se que a banda devido à amina alifática (1100 cm^{-1}) diminui de intensidade, o que denota o "bloqueio" destes pelo glutaraldeído.

Figura similar à 5.2.4-A foi obtida para os experimentos realizados a 4°C (5.2.4-B).

Observa-se que as bandas da região de $1000\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ diminuem à medida que a membrana reage com o glutaraldeído, enquanto que o pico a 1650 cm^{-1} continua forte, devido à presença de umidade nas membranas, que pode ser considerada constante, já que todas as membranas tiveram espectro extraído segundo o mesmo procedimento. Caso realizássemos as medidas em membranas secas, poderia haver a influência do grau de secagem (que pode variar), na quantificação relativos dos picos amino.

A boa correlação da relação $1077\text{ cm}^{-1} / 1650\text{ cm}^{-1}$ com o tratamento com glutaraldeído, mostra que a quantificação realizada através desse método foi bastante útil e pode ser usada como um indicativo relativamente sensível da reação de reticulação.

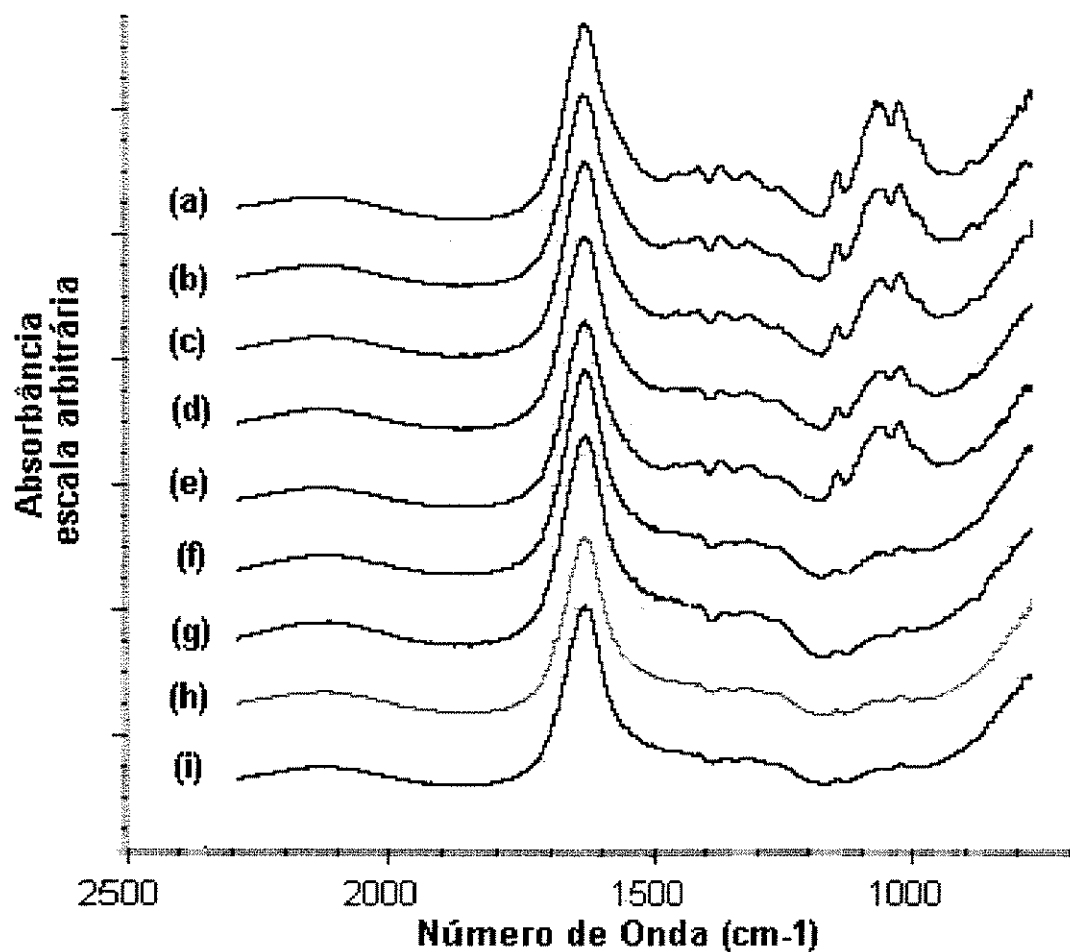


Figura 5.2.4-A: Espectro de IR de: membranas de quitosana úmidas tratadas com glutaraldeído conforme plano fatorial a $T= 21^{\circ}\text{C}$: (concentração, tempo). (a) 0,05%, 5,5 min; (b) 0,116%, 2,32 min; (c) 0,116%, 8,68 min; (d) 0,275%, 1 min; (e) 0,275%, 5,5 min; (f) 0,275%, 10 min; (g) 0,434%, 2,32 min; (h) 0,434%, 8,68 min; (i) 0,5%, 5,5 min.

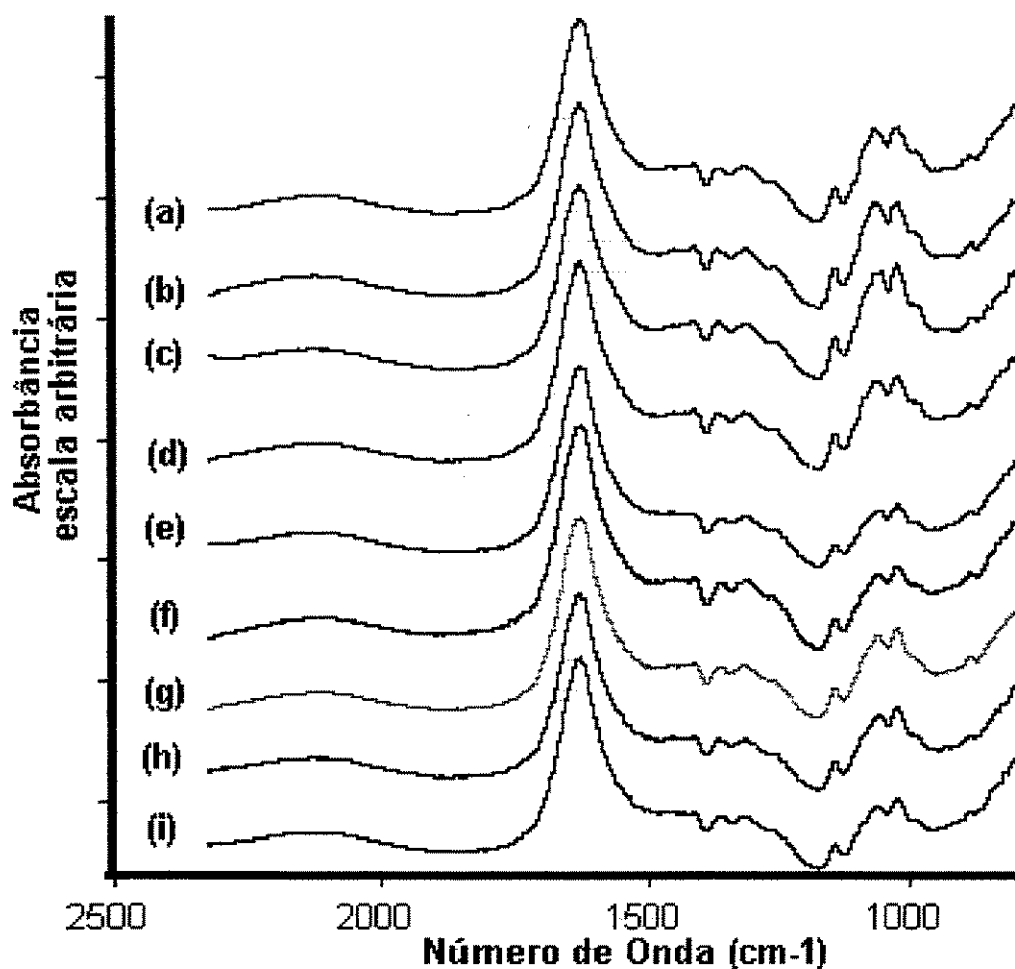


Figura 5.2.4-B: Espectro de IR de: membranas de quitosana úmidas tratadas com glutaraldeído conforme plano fatorial a $T = 4^{\circ}\text{C}$: (concentração, tempo). (a) 0,05%, 5,5 min; (b) 0,116%, 2,32 min; (c) 0,116%, 8,68 min; (d) 0,275%, 1 min; (e) 0,275%, 5,5 min; (f) 0,275%, 10 min; (g) 0,434%, 2,32 min; (h) 0,434%, 8,68 min; (i) 0,5%, 5,5 min.

5.2.5. Difusão de íons

Através de medida com micrômetro, foi obtida a espessura média das membranas de quitosana usadas nos ensaios de difusão de íons:

Película 1 : $11,8 \pm 1,5 \mu\text{m}$

Película 2 : $11,1 \pm 1,9 \mu\text{m}$

Foram realizados ensaios com soluções 1M de NaCl (2,39 mS/cm), 1M KCl (3,03 mS/cm), 1M de CaCl_2 (3,56 mS/cm), 1M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3,07 mS/cm), 1M de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3,49 mS/cm).

Reticulação da membrana para ensaio de difusão.

Para evitar que a película reticulada não quebrasse devido à pressão osmótica, foi realizada uma reticulação branda, deixando-se a membrana por 2,5 min em 70 ml de solução 0,18% glutaraldeído.

Foi medida a concentração de glutaraldeído antes e depois do processo (229 nm), tendo sido incorporado cerca de 0,12g de glutaraldeído na membrana densa a ser usada no ensaio de difusão.

O comportamento de difusão está mostrado na figura 5.2.5-A e a tabela 5.2.5-A apresenta o cálculo do coeficiente de difusão. (A concentração da solução dos sais inicialmente era de 1,0 M).

Tabela 5.2.5-A: Tabela de dados para cálculo do coeficiente de difusão através das membranas de quitosana e dados de referência.

reticulada	delta condutivi- dade final	delta condutivi- dade inicial	Coeficiente de difusão através da membrana (cm ² /s) (calculado)	Coeficiente de difusão de cátions livres (cm ² /s)*	Raios iônicos (pm) e número de coordenação**	Raios atômicos hidratados (pm)#
Na	0,128	2	$2,20 \cdot 10^{-7}$	$1,334 \cdot 10^{-5}$	98 ¹⁺	358
K	0,136	2	$2,25 \cdot 10^{-7}$	$1,957 \cdot 10^{-5}$	138 ¹⁺	331
Mg	0,538	2	$1,15 \cdot 10^{-7}$	$0,792 \cdot 10^{-5}$	78 ²⁺	428
Ca	0,568	2	$1,01 \cdot 10^{-7}$	$0,706 \cdot 10^{-5}$	106 ²⁺	412
natural	delta condutivid ade final	Delta condutivida de inicial	Coeficiente de difusão através da membrana (cm ² /s) (calculado)	Coeficiente de difusão de cátions livres (cm ² /s)*	Raios iônicos (pm) e número de coordenação**	Raios atômicos hidratados (pm)#
Na	0,044	2	$3,05 \cdot 10^{-7}$	$1,334 \cdot 10^{-5}$	98 ¹⁺	358
K	0,040	2	$3,13 \cdot 10^{-7}$	$1,957 \cdot 10^{-5}$	138 ¹⁺	331
Mg	0,404	2	$1,28 \cdot 10^{-7}$	$0,792 \cdot 10^{-5}$	78 ²⁺	428
Ca	0,460	2	$1,18 \cdot 10^{-7}$	$0,706 \cdot 10^{-5}$	106 ²⁺	412
$\beta = 694,4 \text{ cm}^{-2}$						

* extraído de Lide et alli, 1994.

** extraído da tabela periódica da SBQ (1995), seguindo as recomendações da IUPAC.

extraído de Conway, 1981.

Nota-se que as membranas reticuladas apresentam coeficientes de difusão menores. Segundo dados da tabela periódica, nota-se que a difusividade através da membrana tem influência maior da carga do cátion do que do seu tamanho. Isto frisa que a permeação dos íons através da membrana não é simplesmente mecânica, mas os

cátions apresentam uma interação com a membrana, principalmente os bivalentes que podem ser melhor ancorados nos grupos da quitosana.

O fato das membranas reticuladas reterem mais os cátions pode ser devido à rigidez que as cadeias tomam após a reticulação com glutaraldeído que pode formar ligações π (Mossan et alli, 1975).

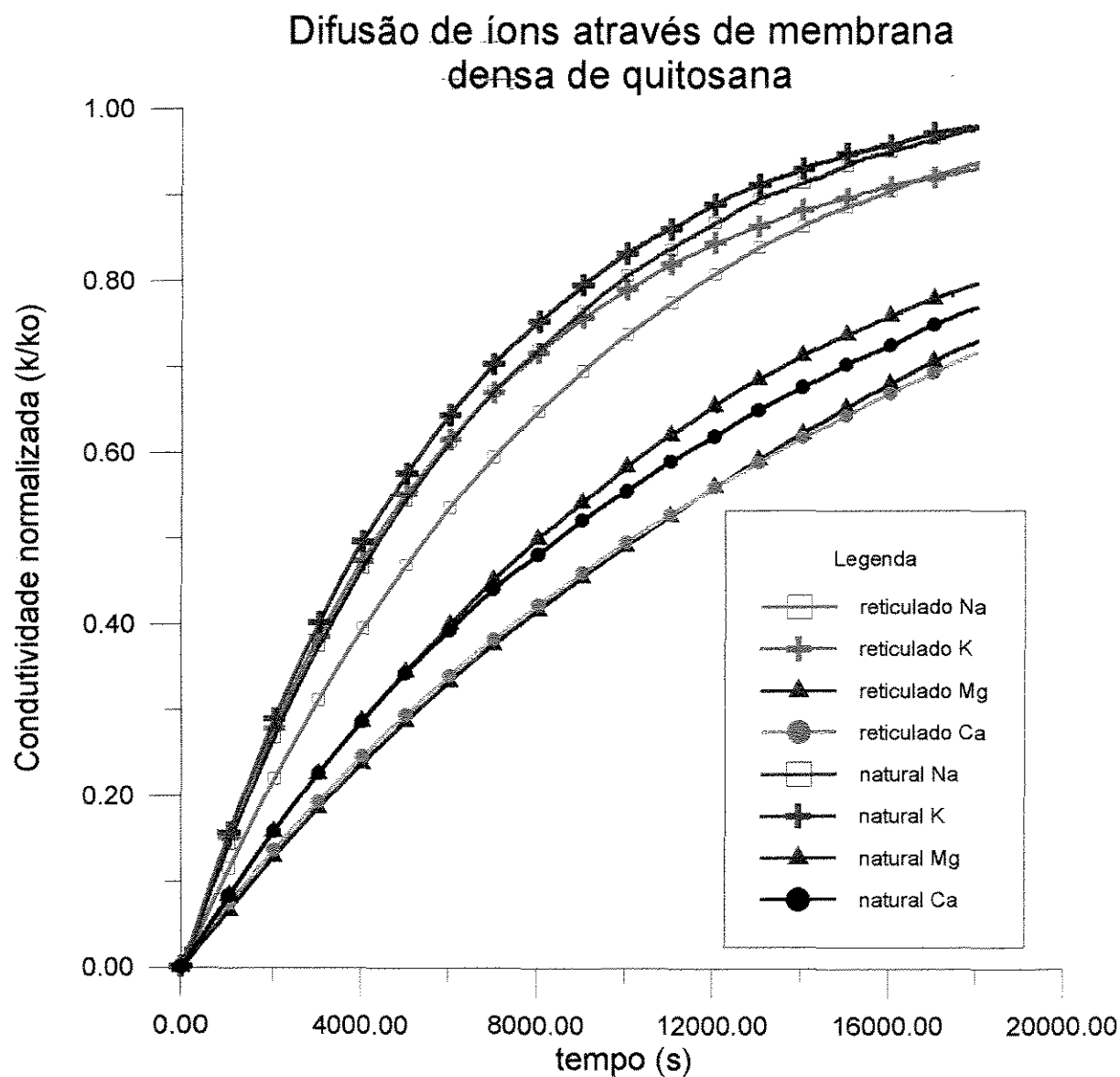


Figura- 5.2.5-A: Gráfico de concentração vs tempo para membrana densa de quitosana.

5.2.6. Titulação potenciométrica

Através da titulação potenciométrica, nota-se que a quitosana bastante reticulada, praticamente não apresenta grupos amino protonáveis. Praticamente aparece somente uma inflexão, que representa o consumo de NaOH para neutralizar o HCl adicionado (0,6 equivalente).

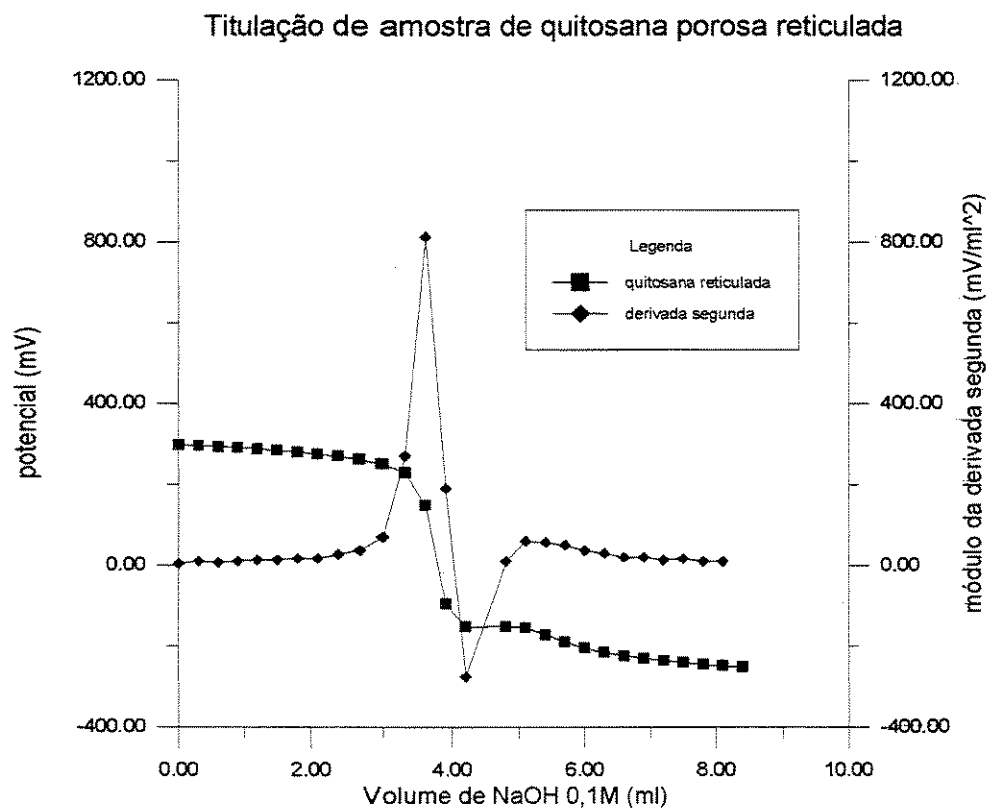


Figura 5.2.6-A: Titulação potenciométrica de membrana de quitosana com reticulação severa.

5.3. Tratamento das membranas de quitosana com poli(ácido acrílico)-PAA

5.3.1. Adsorção de PAA

Segundo as medidas de absorbância (UV) na solução:

Os dados da adsorção de PAA são mostrados na tabela 5.3.1-A.

Tabela 5.3.1-A: Dados de adsorção de PAA de acordo com a concentração inicial de PAA nas membranas de quitosana, pelo método da absorbância da solução a 229 nm.

PM (PAA)	Massa de quitosana natural (g)	Massa de quitosana reticulada (g)	Quantidade (g) adsorvida de PAA em quitosana natural por vol (ml) solução PAA	Quantidade (g) adsorvida de PAA em quitosana reticulada por vol (ml) solução PAA
-	0,072	0,0477	0	0
450.000	0,0987	0,125	0,049737	0
450.000	0,1006	0,097	0,027992	0
1.000.000	0,1185	0,0951	0,074819	0
1.000.000	0,1015	0,1256	0,017143	0,011465

Concentração final de PAA na solução pós-adsorção

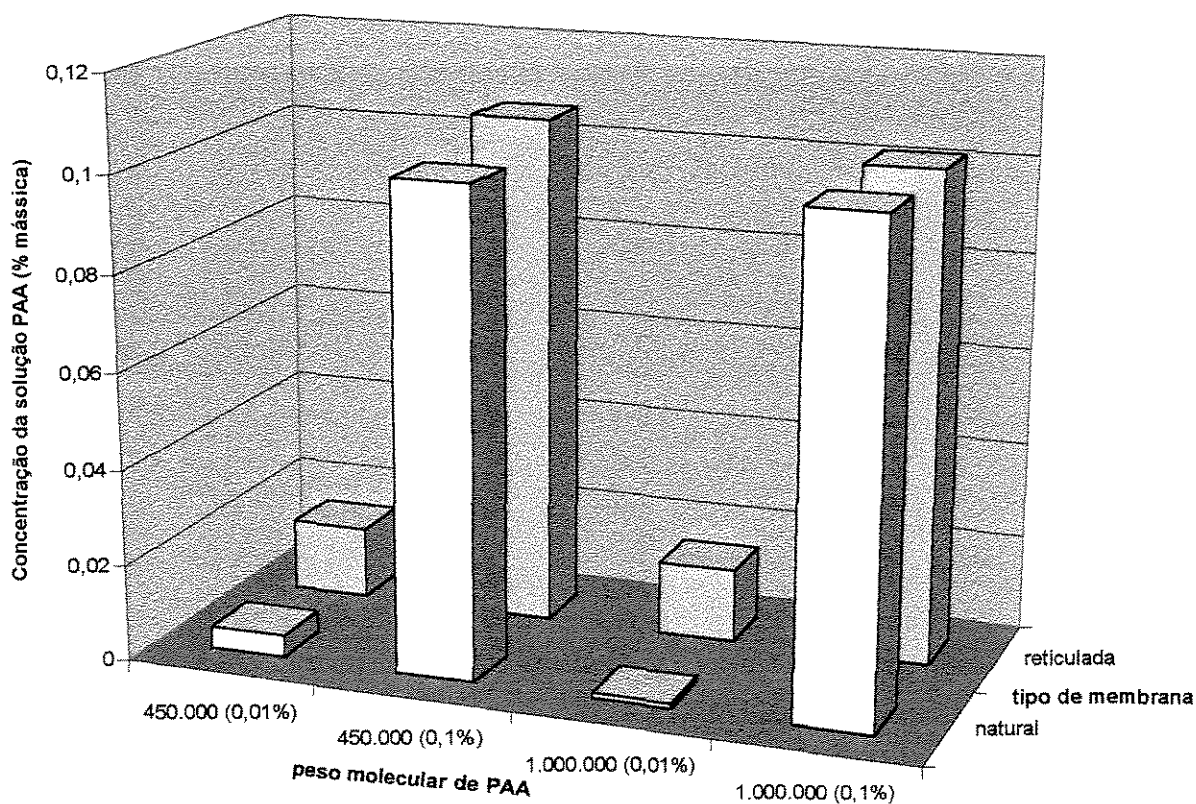


Figura 5.3.1-A: variação da concentração final de PAA de acordo com PM de PAA e reticulação das membranas.

Tabela 5.3.1-B: Efeitos de concentração de PAA, reticulação da membrana e peso molecular de PAA na adsorção, segundo as medidas de UV realizadas na solução.

Fator	Efeito sobre a concentração de PAA adsorvido
Reticulação	-0,0198
PM do PAA	0,0032
Concentração	-0,0085
Reticulação X PM do PAA	-0,0003
Reticulação X Concentração	0,0114
PM do PAA X Concentração	-0,0031
Reticulação X PM do PAA X Concentração	0,0059

Observa-se que os principais fatores são a reticulação da membrana e a concentração de PA, na quantidade de PAA adsorvido.

Segundo as medidas espectroscopia de IV nas membranas:

A figura 5.3.1-A mostra a variação da concentração final de PAA de acordo com o peso molecular de PAA e a reticulação das membranas densas.

A figura 5.4.1-B mostra como varia o espectro de IV da quitosana de acordo com a adsorção de PAA.

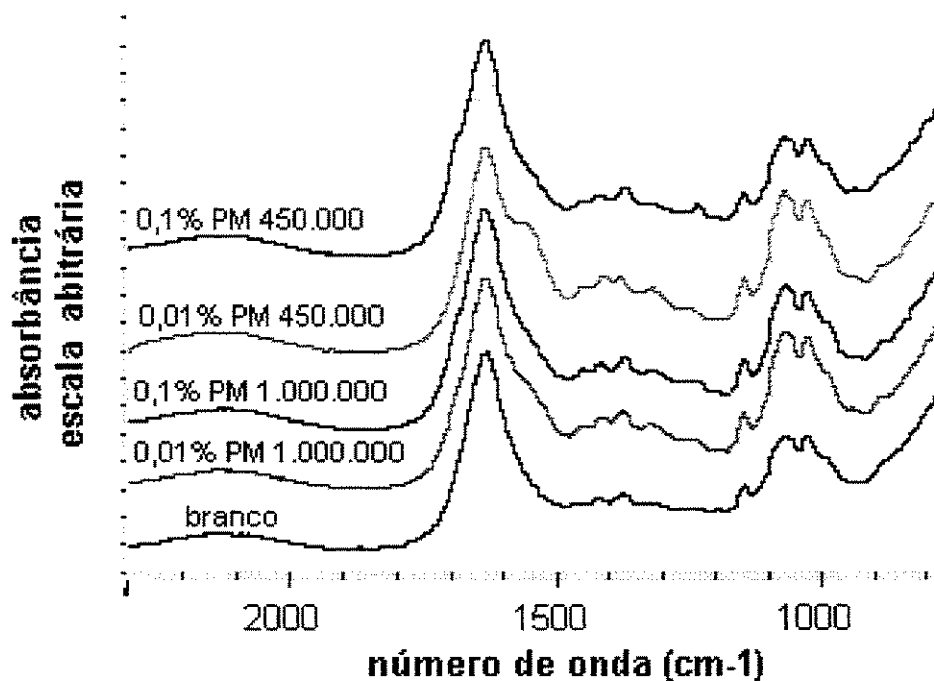


Figura 5.3.1-B: Espectro de IV da quitosana natural com adsorção de PAA.

Tabela 5.3.1-C: Tabela da razão de altura de picos $1400\text{ cm}^{-1}/1080\text{ cm}^{-1}$.

	Natural	reticulada
0,01% PM 450.000	$0,54 \pm 0,1$	—
0,1% PM 450.000	$0,67 \pm 0,1$	—
0,01% PM 1.000.000	$0,55 \pm 0,1$	—
0,1% PM 1.000.000	$0,58 \pm 0,1$	—
branco	$0,43 \pm 0,1$	—

Nota-se que para as amostras reticuladas, não foi possível ter os valores da tabela acima calculados, pois os picos praticamente inexistiam. Quanto menor o valor da razão dos picos (carboxila/amino), há uma menor adsorção de PAA.

Observa-se que, segundo as medidas de IV, o principal fator para a adsorção de PAA (refletido pelos picos de 1400 e 1080 cm^{-1}) é a reticulação da membrana. O peso molecular (PM) do PAA, apresenta um efeito positivo, mas há uma indicação de que a concentração apresenta efeito maior. Isso se justificaria pelo fato de que adsorbatos poliméricos de cadeia maior (PM maior), possuem pontos de ancoragem em maior número, tornando a adsorção praticamente irreversível e mais efetiva (Adamson, 1990).

Como em nosso caso não queremos uma adsorção acentuada, mas sim, apenas o suficiente para ocorrer uma cobertura mais fina de PAA na superfície da quitosana, utilizamos o PAA de PM 450.000 com uma concentração de 0,1M para a preparação de substratos a serem usados nos ensaios de calcificação.

Tabela 5.3.1-D: Efeitos de concentração de PAA, reticulação da membrana e peso molecular de PAA na adsorção, segundo os espectros de IV realizadas nas membranas.

Fator	Efeito sobre razão de pico (1400/1800)
Reticulação	-0,291
PM do PAA	0,009
Concentração	0,020
Reticulação X PM do PAA	0,009
Reticulação X Concentração	-0,020
PM do PAA X Concentração	-0,013
Reticulação X PM do PAA X Concentração	0,013

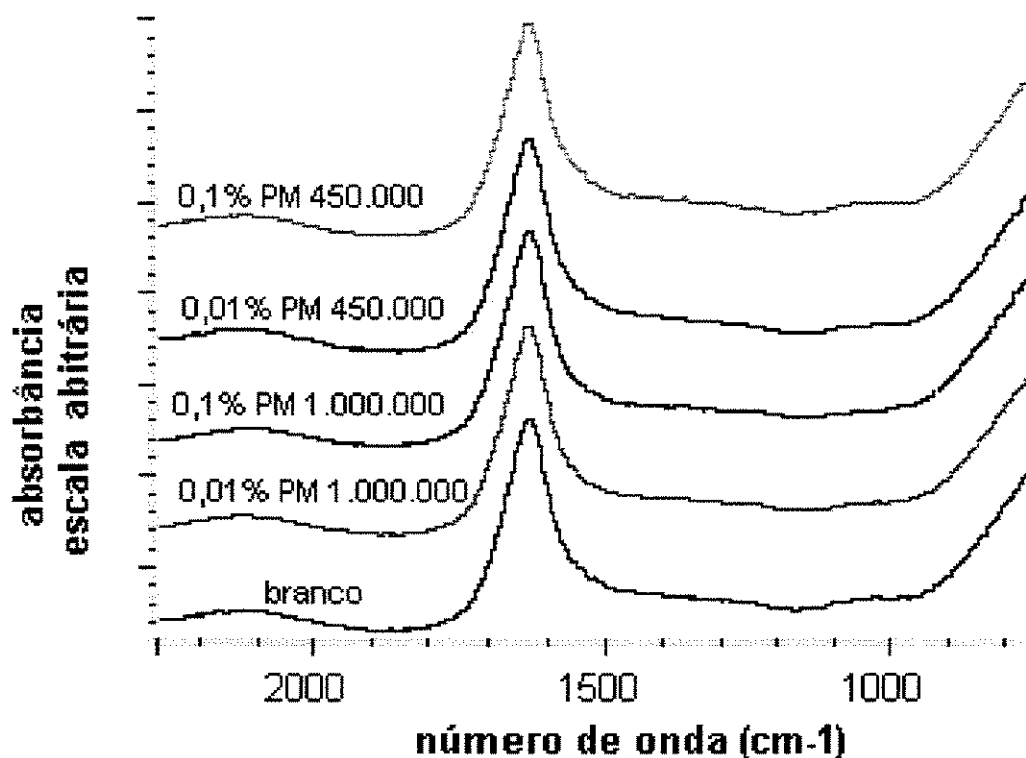


Figura 5.3.1-C: Espectro de IV da quitosana reticulada com adsorção de PAA.

Foi previsto que nas membranas reticuladas, praticamente não haveria adsorção de PAA, pois as moléculas do ácido interagiriam principalmente com os grupos amino da quitosana. Nas membranas reticuladas os grupos aminos estão indisponibilizados, pois ligam-se às moléculas de glutaraldeído.

5.3.2. Titulação potenciométrica

Foi realizada titulação potenciométrica das amostras porosas naturais e reticuladas com glutaraldeído, após adsorção de PAA, e o gráfico é mostrado na figura 5.3.2-D. O procedimento usado é o mesmo descrito na seção 4.1.1.2.

O gráfico de titulação mostra que na membrana natural o comportamento não apresenta muito claramente um ponto de inflexão, o que é típico de polieletrólitos. Também houve um maior consumo de OH^- , provavelmente devido aos grupos terminais carboxílicos que não estivessem interagindo-se com os grupos aminos.

Os cálculos revelaram que:

Membrana	Massa seca (mg)	mMol quitosana	mMol NaOH	% protonáveis
PAA R puro	75,6	0,47	0,12	25,6
PAA N puro	88,7	0,55	0,18	32,7

O fato do número de grupos tituláveis com OH^- na membrana natural ser menor após a adsorção de PAA, mostra que o PAA deve realmente ter-se adsorvido fortemente aos grupos amino através de suas terminações carboxílicas. O mesmo ocorre com a quitosana reticulada, mas ainda há uma menor porcentagem que a membrana natural, já que deve haver uma menor disposição de grupos aminos protonáveis e, conseqüentemente, de terminais carboxílicos.

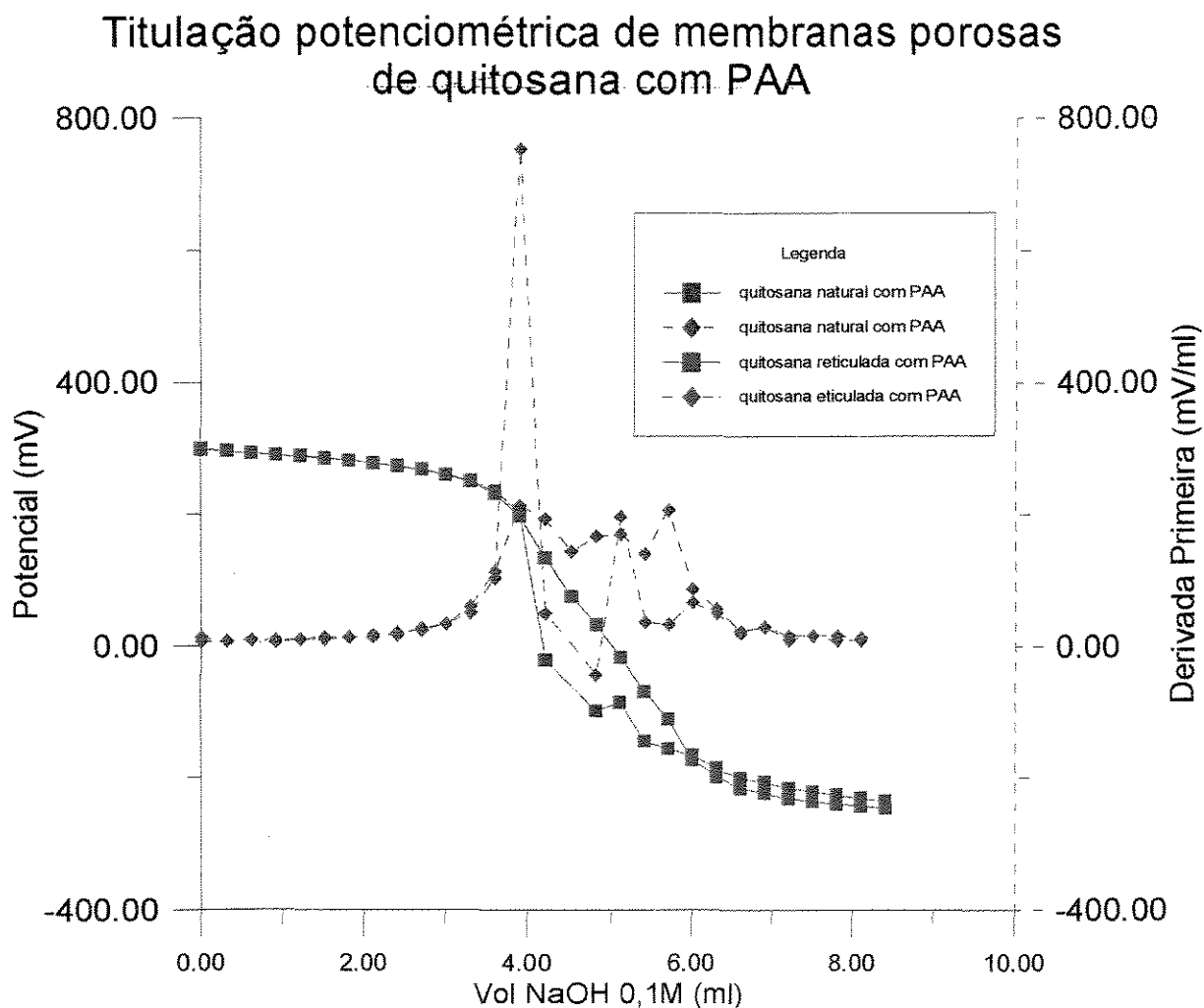


Figura 5.3.2-D: titulação potenciométrica das amostras porosas após adsorção de PAA.

5.4. Ensaios de calcificação de quitosana in vitro

5.4.1. Pré-tratamento da quitosana para calcificação

Reticulação com glutaraldeído:

Com a reticulação branda, só foi possível observar o grau de reticulação através dos espectros de IV (direto na membrana), pois o método de quantificação de glutaraldeído adsorvido por diferença na absorbância das soluções antes e depois do processo, na região de UV, é pouco sensível às quantidades envolvidas.

No entanto, para a reticulação severa, foi possível obter em média, a quantidade de glutaraldeído adsorvido através da diferença de absorbância das soluções:

Glutaraldeído reagido: 0,1401g/unidade (substrato poroso)
 0,4193g/unidade (substrato denso)

Para as amostras tratadas dessa maneira, utilizamos, por conveniência a seguinte nomenclatura para a identificação das amostras:

Legenda: FN - filme natural (membrana densa de quitosana natural)
 FR - membrana densa de quitosana reticulada
 PN - membrana porosa de quitosana natural
 PR - membrana porosa de quitosana reticulada

Adsorção de PAA:

Através da diferença de absorbância (a 229 nm) das soluções de PAA antes e depois do tratamento, tivemos os seguintes resultados de quantidade de PAA adsorvido por unidade de membrana:

FN - 0,5225mg/unidade ou 1,0707% (w/w)
FR - 0,1318mg/unidade ou 0,2721% (w/w)
PN - 2,1025mg/unidade ou 1,5364% (w/w)
PR - 1,2450mg/unidade ou 0,6422 % (w/w)

As membranas reticuladas com glutaraldeído apresentam adsorção de PAA.

5.4.2. Ensaio de calcificação

5.4.2.1. Ensaio a longo prazo

A longo prazo, mesmo após 1,5 mês, as membranas de quitosana a pH 7,2 não sofreram deposição.

5.4.2.2. Ensaio a curto prazo

Para os ensaios a curto prazo, utilizamos as seguintes massas úmidas de membrana (quatro unidades de cada tipo).

Tabela 5.4.2.2-A: Massa úmida dos substratos dos ensaios de calcificação a curto prazo.

pH	Massa úmida (g)			
	FN	PN	FR	PR
7,8	0,1043	0,4132	0,1176	0,3524
7,4	0,0838	0,3238	0,0928	0,2431
7,2	0,0941	0,3609	0,0891	0,3783
7,4 Ca	0,0837	0,3809	0,0937	0,3691
7,4 P	0,1022	0,4319	0,0791	0,4237
7,4 PAA	0,1952	0,5474	0,1937	0,7755
7,8 c/ tensões	0,1043	-	-	-

5.4.2.2.1. pH das soluções calcificantes

O pH e o aspecto das soluções foram acompanhados a cada troca de solução, e os resultados estão mostrados na tabela 5.4.2.2.1-A.

Tabela 5.4.2.2.1-A: pH e aspecto da solução antes de substituição por solução recém-preparada.

	FCS1,0	48hs	FCS1,5	48hs	FCS1,5	72hs	
Amostra	pH	aspecto	pH	aspecto	pH	aspecto	calcificação
FN 7,8	7,60	límpido	7,74	precipitado	7,94	precipitado	bem coberta
PN 7,8	7,77	límpido	7,73	precipitado	7,92	precipitado	Rugoso
FR 7,8	7,79	límpido	7,75	precipitado	7,95	precipitado	Coberta
PR 7,8	7,78	límpido	7,78	precipitado	7,97	precipitado	rugoso
Branco 7,8	7,84	límpido	7,76	precipitado	7,96	precipitado	-
FN 7,4	7,69	límpido	7,58	precipitado	7,57	turva	
PN 7,4	7,36	límpido	7,47	precipitado	7,88	precipitado	rugoso
FR 7,4	7,69	límpido	7,53	precipitado	7,66	precipitado	coberto
PR 7,4	7,29	límpido	7,58	precipitado	7,77	precipitado	liso
branco 7,4	7,53	límpido	7,50	precipitado	7,79	precipitado	_
FN 7,2	7,27	límpido	7,30	límpido	7,39	límpido	Sem cobertur
PN 7,2	7,30	límpido	7,30	límpido	7,62	límpido	liso
FR 7,2	7,20	límpido	7,25	límpido	7,50	límpido	Sem cobertur
PR 7,2	7,25	límpido	7,32	límpido	7,51	límpido	liso
branco 7,2	7,17	límpido	7,25	límpido	7,62	límpido	_
FN Ca	7,64	límpido	7,46	precipitado	7,66	precipitado	Bem coberto
PN Ca	7,65	límpido	7,37	precipitado	7,51	turva	Rugoso
FR Ca	7,63	límpido	7,47	precipitado	7,67	precipitado	coberto
PR Ca	7,64	límpido	7,44	precipitado	7,59	precipitado	liso
branco Ca	7,67	límpido	7,50	precipitado	7,66	precipitado	_
FN P	7,62	límpido	7,34	precipitado	7,66	precipitado	Bem coberta
PN P	7,62	límpido	7,34	precipitado	7,65	precipitado	Rugoso
FR P	7,58	límpido	7,36	precipitado	7,63	precipitado	Rugoso
PR P	7,61	límpido	7,44	precipitado	7,66	precipitado	rugoso
branco P	7,65	límpido	7,5	precipitado	7,66	precipitado	_
FN PAA	7,59	límpido	7,62	precipitado	7,83	floculado	O mais cober
PN PAA	7,62	límpido	7,64	límpido	7,89	límpido	rugoso
FR PAA	7,58	límpido	7,61	límpido	7,70	límpido	coberto
PR PAA	7,58	límpido	7,63	límpido	7,83	límpido	rugoso
branco PAA		límpido	7,52	límpido	7,83	precipitado	_
FN tensão	7,88	límpido	7,75	precipitado	7,98	precipitado	coberto

5.4.2.2.2. Análises de P e Ca na solução calcificante

Através das análises elementares de P e Ca na solução, pôde-se notar que as concentrações [P] eram muito bem reprodutíveis, mas a análise de cálcio era muito sensível ao tempo de preparação da solução a ser lida fluorometricamente. Isso induziu a uma maior margem de erros por parte das análises de cálcio. Mesmo assim, foi possível observar vários resultados significativos.

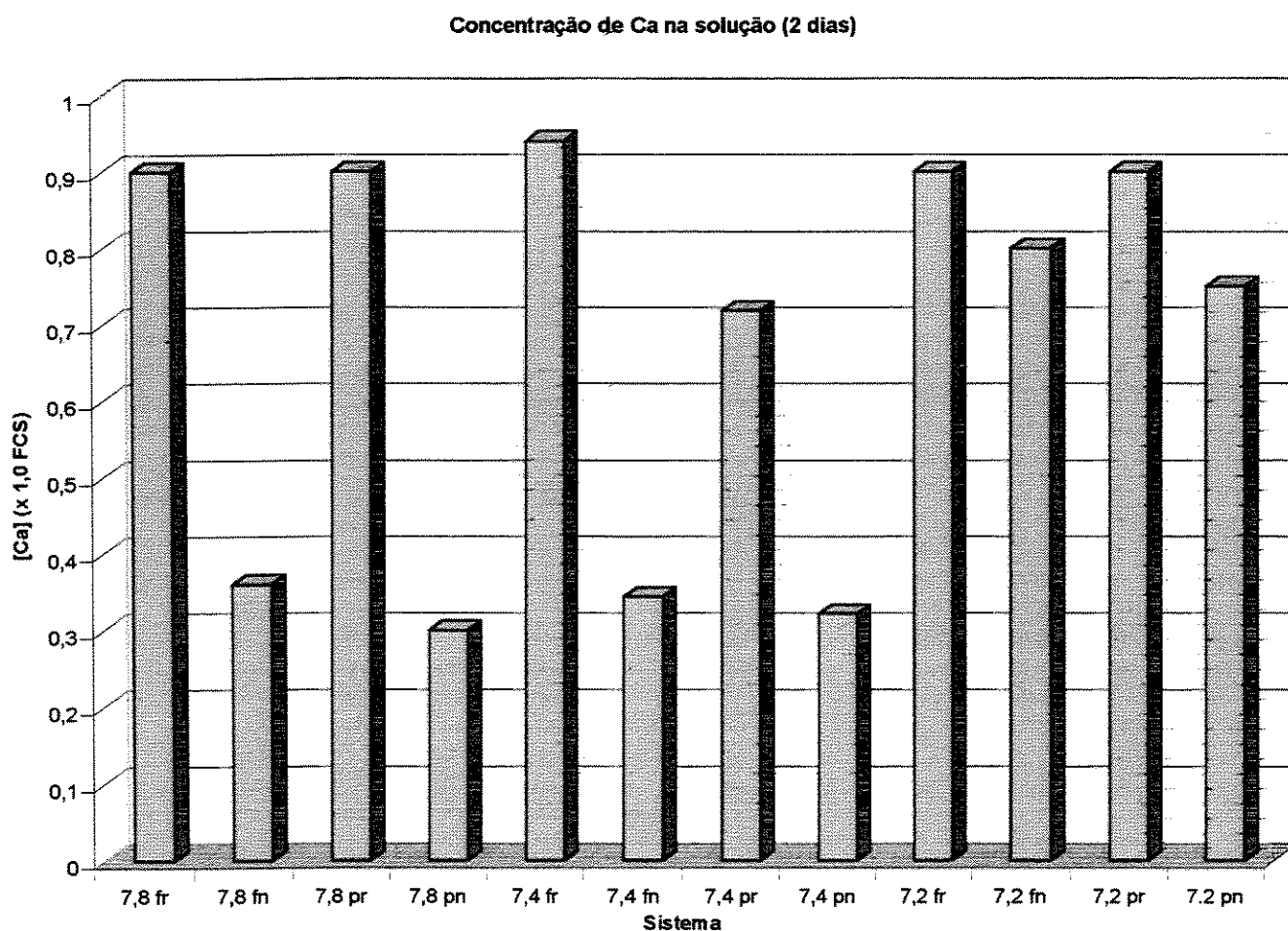


Figura 5.4.2.2.2-A: Análise de cálcio para as soluções 1,0 FCS a pH's 7,2, 7,4, 7,8, após contato com quitosana.

A análise de cálcio apresentou, para cada medida, um erro médio de $\pm 0,05$, o que significa que na figura acima, só são significativas as diferenças das concentrações de cálcio entre as membranas naturais e reticuladas nos filmes e membranas porosas de quitosana a pH 7,8 e 7,4.

Já a pH 7,2, devido às limitações do método, não se pode afirmar que as amostras apresentem diferenças significativas de concentração de Ca na solução.

Nota-se, então, que as amostras naturais consomem mais cálcio que as reticuladas e que o pH é um fator muito importante na deposição de compostos de cálcio.

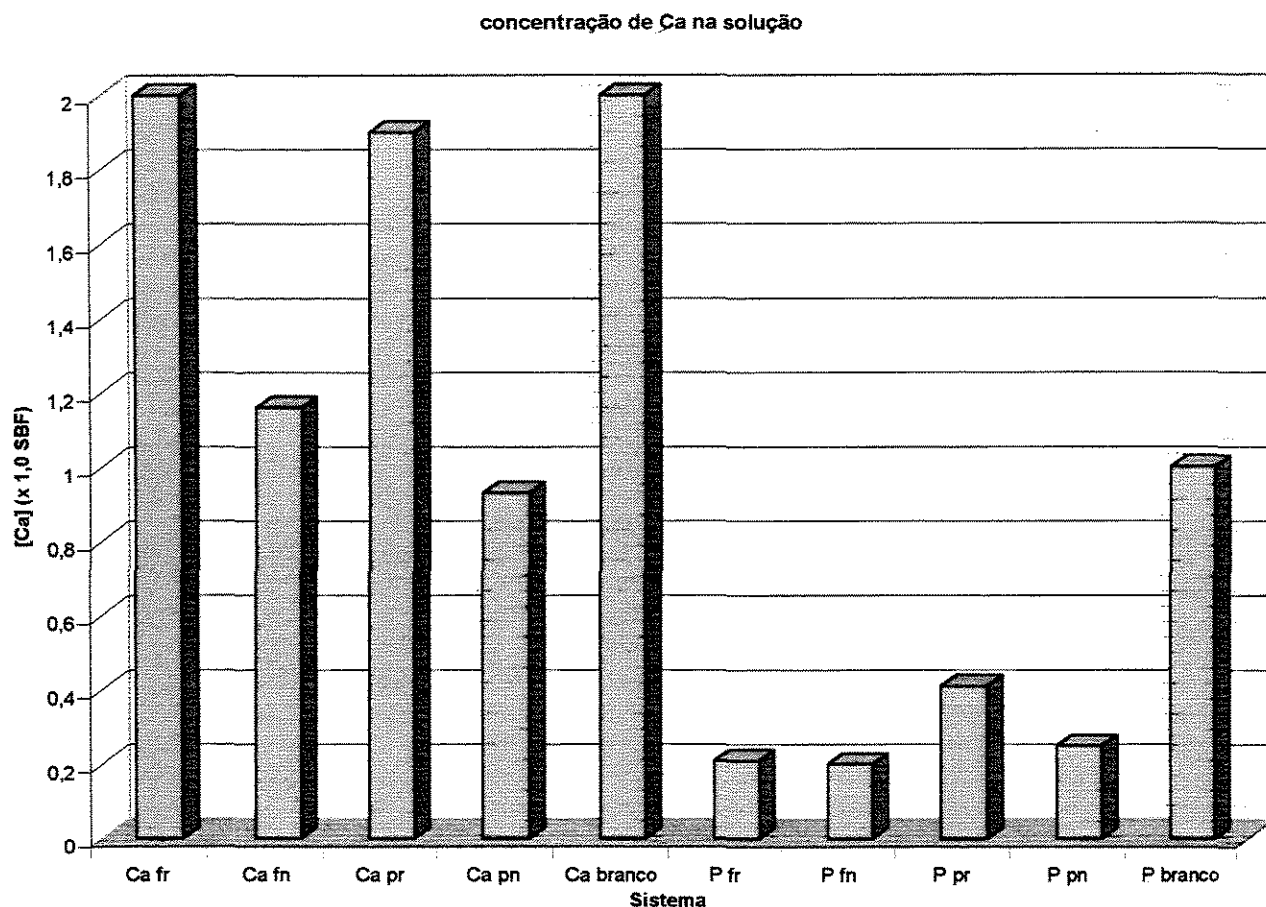


Figura 5.6.2.2.2-B: Análise de cálcio para as soluções 1,0 FCS com [Ca] ou [P] alto e com pH 7,8, após contato com quitosana.

A figura acima mostra a concentração de cálcio na amostra com excesso de Ca, mas com um fator de 0,5 pois, inicialmente, havia o dobro da concentração que normalmente há nas soluções FCS.

Observa-se que há uma grande precipitação (espontânea) quando adiciona-se altos níveis de [P] ou [Ca] e que não necessariamente ocorrem devido à presença das membranas de quitosana, mas devido à supersaturação e efeito do íon comum na solubilidade dos compostos que contêm P e Ca, como as apatitas.

Mesmo assim, há um consumo maior de elemento cálcio nas amostras com excesso de [P] do que com excesso de [Ca].

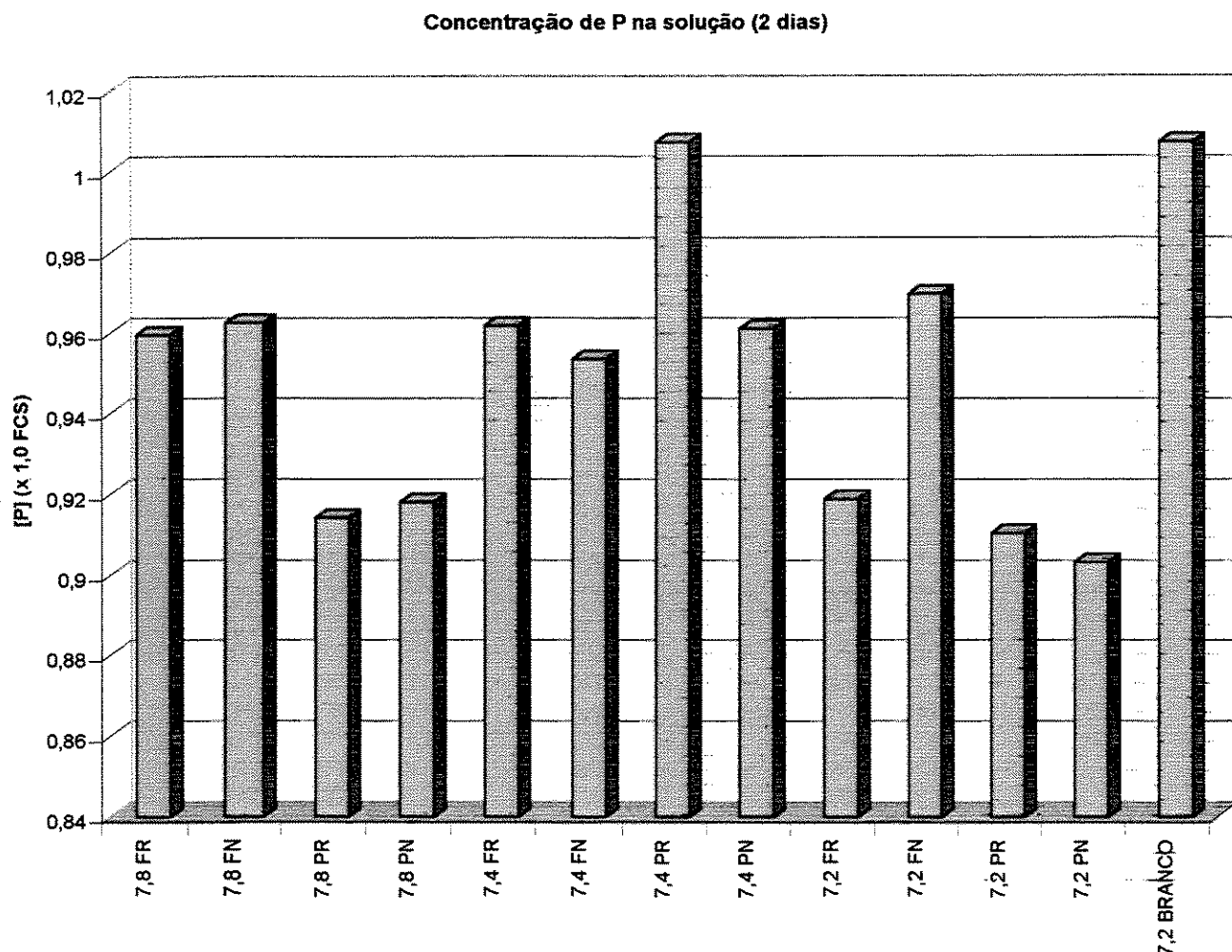


Figura 5.4.2.2.2-C: Análise de fósforo para as soluções 1,0 FCS a pH's 7,2, 7,4, 7,8, após contato com quitosana.

As análises de [P] mostraram uma reprodutibilidade muito maior que as de [Ca]. O erro do método foi de $\pm 0,02$. Segundo esse erro, pode-se afirmar que as amostras consomem pouco fósforo, se comparado com cálcio. Isso pode ocorrer devido ao fato de que os fosfatos dos cátions presentes no FCS normalmente possuem uma solubilidade maior do que os compostos de cálcio, que podem ser formados com os ânions (carbonato e fosfato, principalmente) disponíveis no fluido calcificante.

Nota-se que as amostras de quitosana porosa consomem muito mais fósforo que as amostras densas. As amostras a pH 7,8 não apresentam tanta diferença entre amostra natural e reticulada, pois há um pouco de precipitação espontânea de fosfato nesse pH, mas a pH 7,4 já nota-se diferença de consumo de [P], que é maior nas amostras naturais que nas reticuladas. A pH 7,2, nota-se mais claramente o consumo de [P] por parte das amostras porosas, mas provavelmente não devido à calcificação, pois não foi observada calcificação a esse pH, durante as análises de microscopia no substrato.

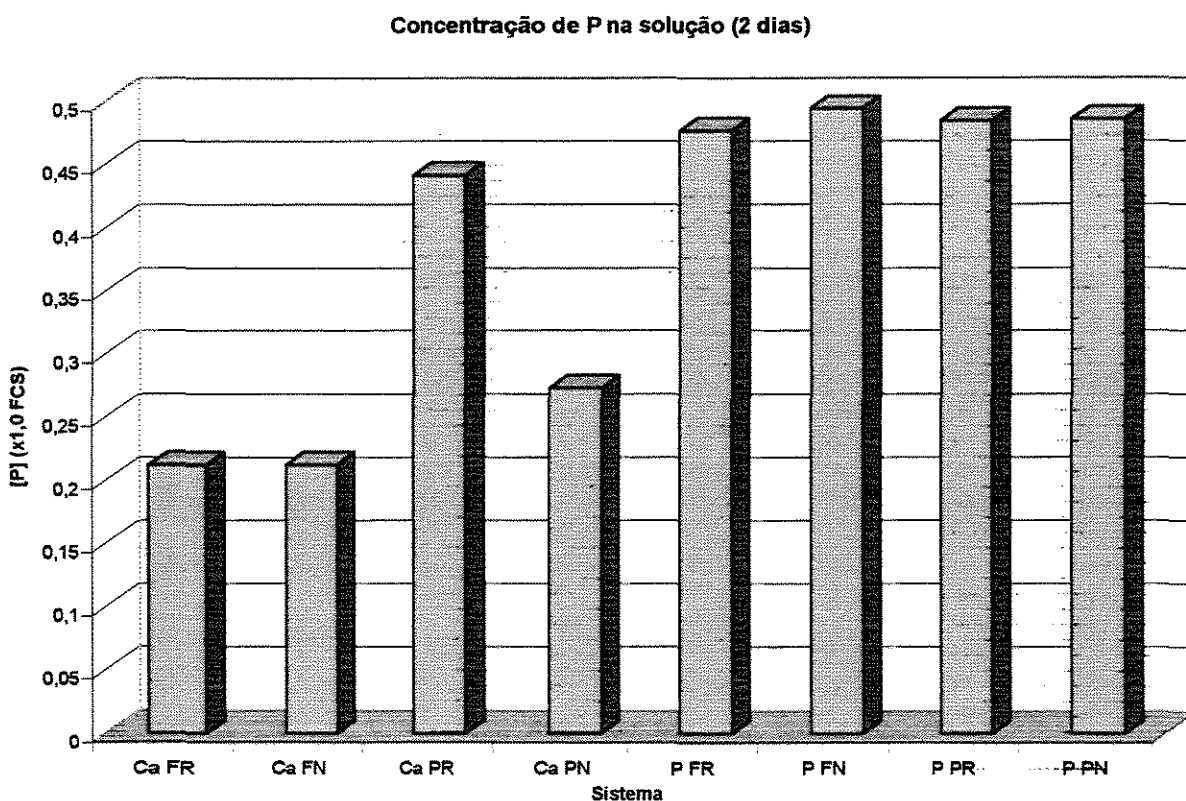


Figura 5.4.2.2.2-D: Análise de fósforo para 1,0 FCS com [Ca] ou [P] alto e pH 7,8, após contato com quitosana.

Nota-se que há um grande consumo de P quando [Ca] é alto, e devido à precipitação espontânea, há um grande consumo de P quando [P] é alto também.

Há um consumo de [P] quando há PAA adsorvido nas membranas de quitosana, mesmo a pH 7,4, maior do que a pH 7,8, mas sem PAA. Isso mostra que PAA induz uma deposição maior de compostos de fosfato de cálcio.

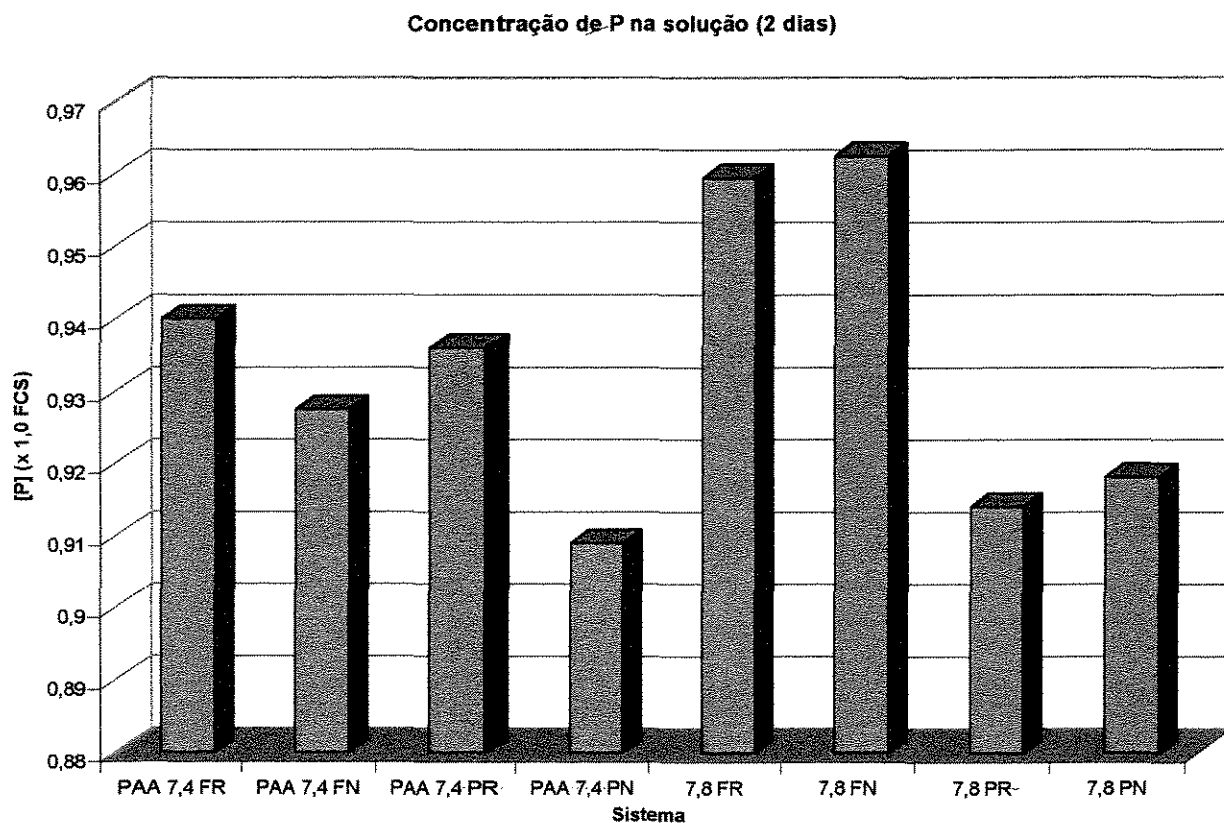


Figura 5.4.2.2-E: Análise de fósforo para 1,0 FCS com pH 7,8, após contato com quitosana sem e com PAA.

5.4.2.3. Avaliação da calcificação nos substratos

5.4.2.3.1. Morfologia

Aspecto macroscópico:



Figura 5.4.2.3.1-A: aspecto macroscópico de membranas densas (onde se nota melhor a calcificação) naturais de quitosana (a) sem calcificação, (b) calcificado com PAA a pH=7,4 , (c) calcificado a pH=7,8.

Observa-se que a calcificação (c) é menos aderida à membrana, pois a pinça consegue marcá-la. Já a com PAA (b), isso não acontece.

Microscopia eletrônica de varredura:

A microscopia eletrônica de varredura forneceu resultados muito significativos quanto à formação e aspecto dos depósitos.

Os resultados para calcificação a curto prazo e reticulação branda estão mostrados na figura 5.4.2.3.1-B.

Observou-se que a solução calcificante guardada à temperatura dos ensaios de calcificação apresentou a formação de flocos de precipitado em 24 h, diferentemente da solução similar guardada à temperatura ambiente que mostrou pouca formação de precipitado mesmo ao final de 7 dias. A microscopia eletrônica de varredura mostrou que a morfologia do precipitado (também lavado e liofilizado) era diferente daquela apresentada pelo material formado sobre a superfície de quitosana (figura 5.4.2.3.1-B). A primeira mostra aglomerados de formatos irregulares e a segunda consiste de sais de fosfato de cálcio esferoidais. Notadamente, há a presença de nucleação e crescimento de apatitas na superfície da matriz, gerando depósitos de morfologia diferentes das obtidas somente no seio da solução. A eventual presença de agregados irregulares mostra que houve também uma pequena deposição de precipitados gerados fora da matriz sobre a superfície. A forma esferoidal dos depósitos de apatitas foi também observado por outros autores (Golomb e Wagner, 1991; Li et alli, 1993).

As amostras densas apresentaram bem menos deposição que as amostras porosas, o que mostra que a permeabilidade de membrana é importante na deposição *in vitro*. Isto é coerente com a necessidade de disponibilização de íons precipitantes em solução numa maior área de matriz, tanto para a formação de núcleos (algumas formas da quitina são bons quelantes de íons cálcio e de certos metais), quanto para a adesão e crescimento desses núcleos.

A figura 5.4.2.3.1-C mostra a morfologia dos precipitados formados em condições de [Ca] ou [P] alto. Nota-se uma grande diferença: a [P] alto, há uma grande conectividade de calcificações com formações de grande área superficial (extremamente floculadas) à matriz de quitosana. A [Ca] alto, há formação de poucas unidades de depósitos maiores, esferoidais, que mantêm pouco contato com a matriz de quitosana.

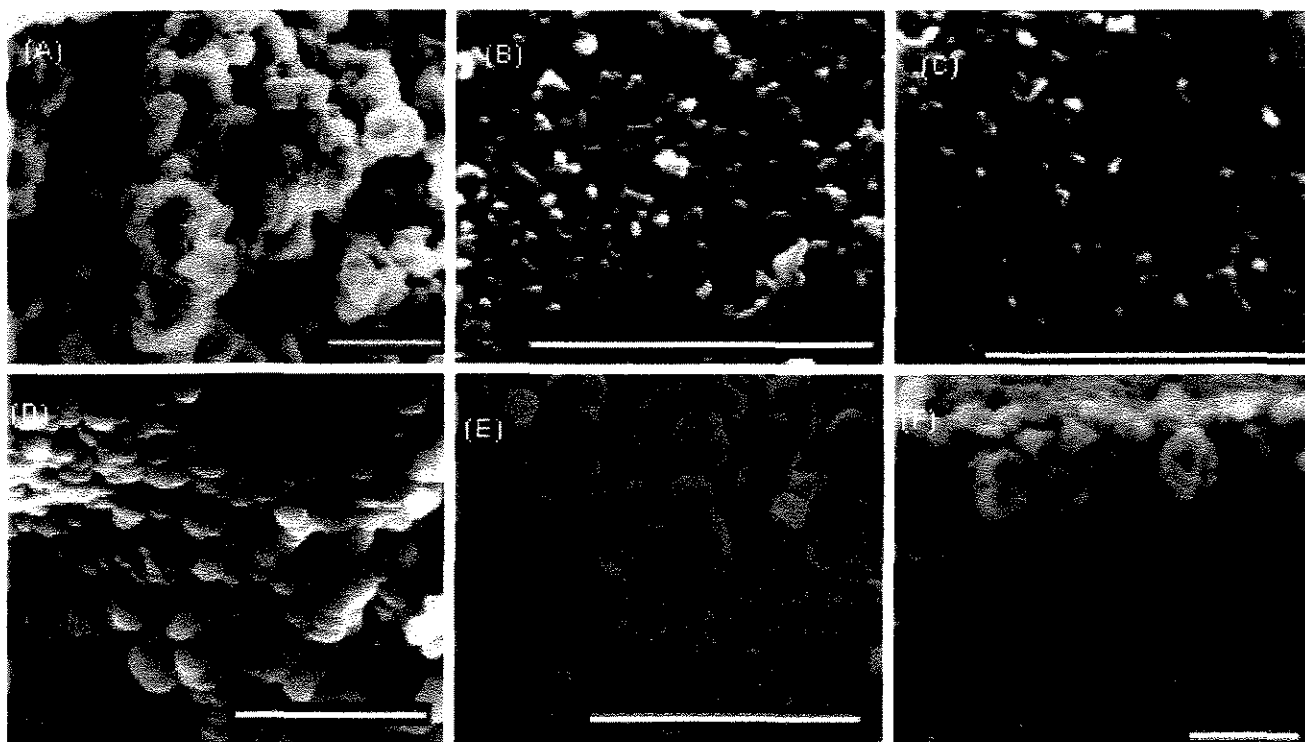


Figura 5.4.2.3.1-B : Micrografias eletrônicas de varredura (A) precipitado; e membranas após calcificação (B) densa, (C) densa reticulada (branda), (D) porosa; (E) porosa reticulada (branda)-e (F) fratura da membrana porosa reticulada. As barras correspondem a 10 μ m.

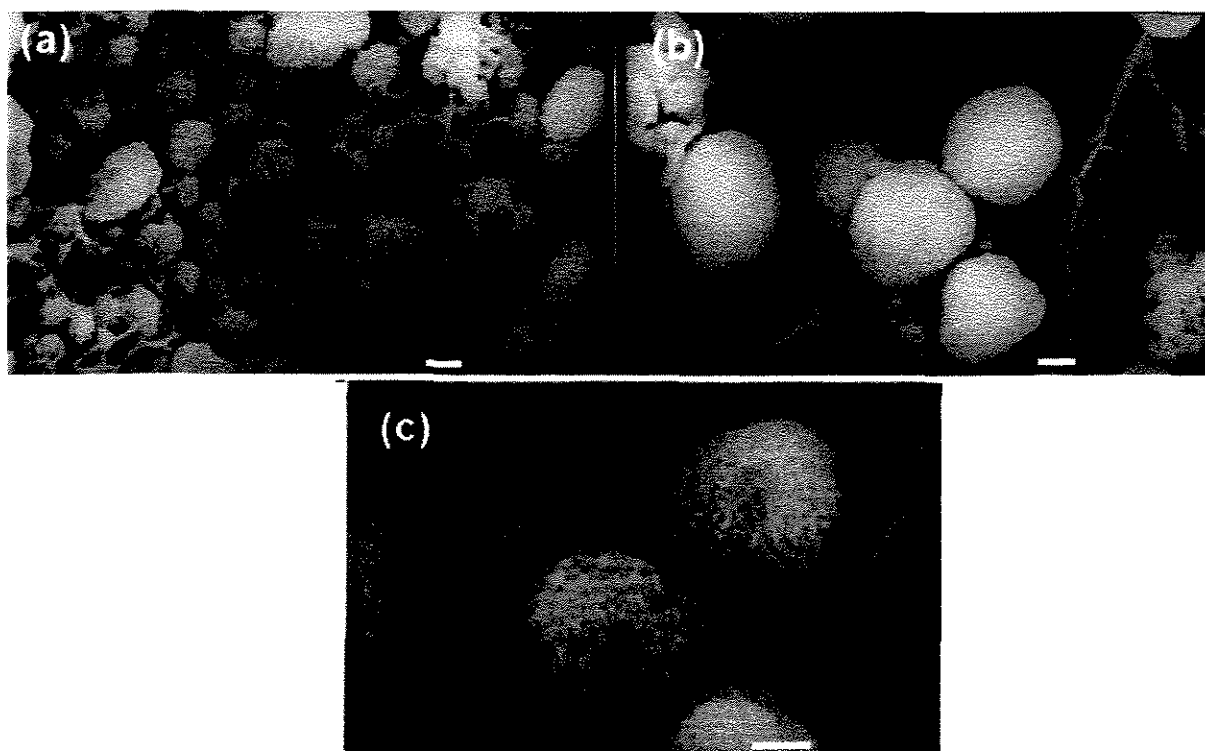


Figura 5.4.2.3.1-C: Micrografia eletrônica de varredura de membranas porosas sem reticulação, a (a) [P] alto, (b) [Ca] alto, (c) ampliação de (b). A barra corresponde a 1 μ m.

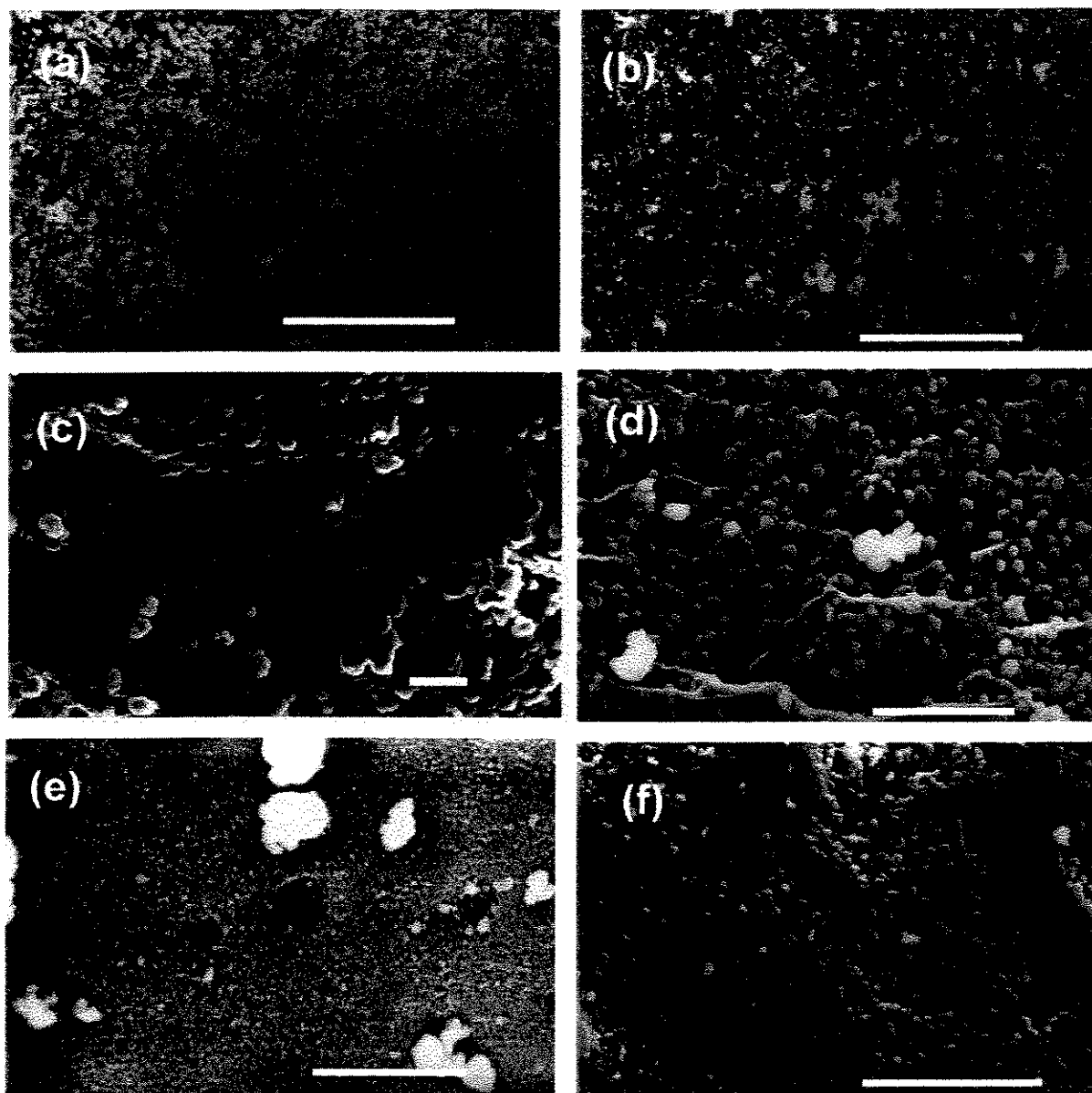


Figura 5.4.2.3.1-D: Micrografias eletrônicas de varredura de membranas de quitosana calcificadas a pH 7,8. (a) e (c) porosa natural, (b) e (d) porosa reticulada, (e) filme natural, (d) filme reticulado. Barras: (a), (b),(f)- 100 μm ;
(e), (c), (d)- 10 μm .

Nota-se uma maior deposição nas amostras naturais que nas reticuladas: nas primeiras, há uma deposição mais uniforme também, tanto nas amostras porosas como densas.

Na foto (e), figura 5.4.2.3.1-D, nota-se os aglomerados brancos que são os precipitados formados espontaneamente, que apenas precipitam sobre a camada mais rente à membrana que é mais aderida e que forma-se devido ao contato com a quitosana.

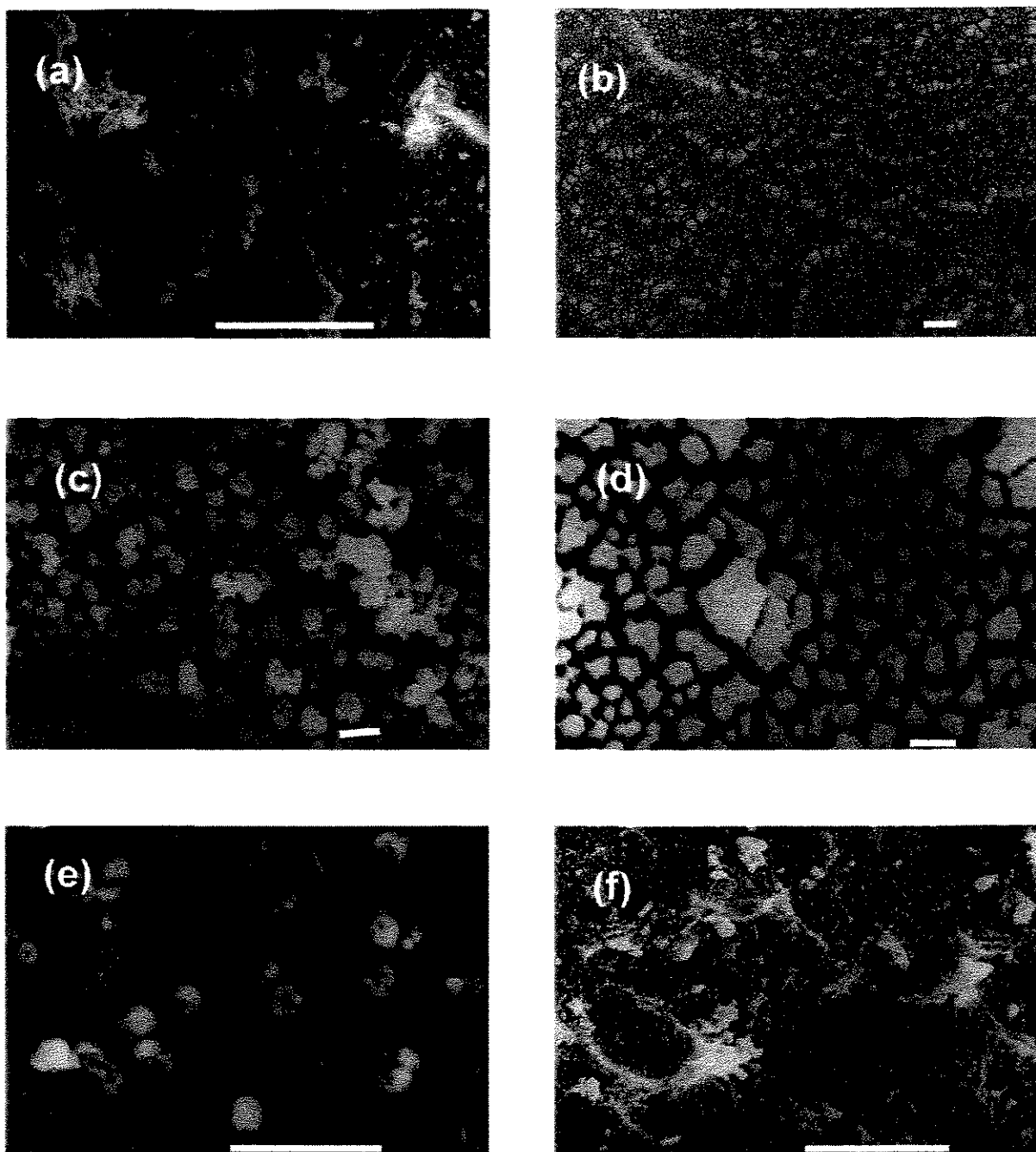


Figura 5.4.2.3.1-E: Micrografia eletrônica de varredura de membranas com PAA calcificadas: (a) PAA PR; (b) PAA PN; (c) aumento de (a); (d) aumento de (b), (e) PAA FR, (f) PAA FN.
Barras: (a) - 100 μm ; (b), (e),(f) - 10 μm ; (c), (d) - 1 μm .

As amostras com mais PAA (quitosana não reticulada) depositam mais do que as não tratadas com PAA e do que as que possuem menos PAA (reticuladas com glutaraldeído). As figuras (b) e (c) mostram uma formação intensa de fase mineral, que não é simplesmente uma morfologia do tipo "lama seca", característica de materiais pouco organizados e amorfos. No entanto, essa formação é embasada sobre uma estrutura "fibrosa", provavelmente aglomerados de PAA.

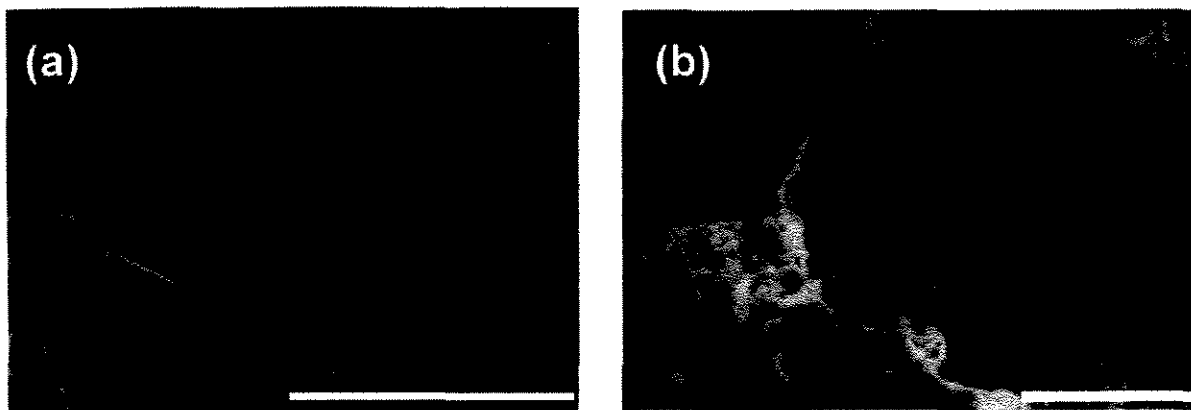


Figura 5.4.2.3.1-F: Micrografias eletrônica de varredura de parte de membrana porosa de quitosana extremamente calcificada. Barra: (a) 100µm; (b) 10µm.

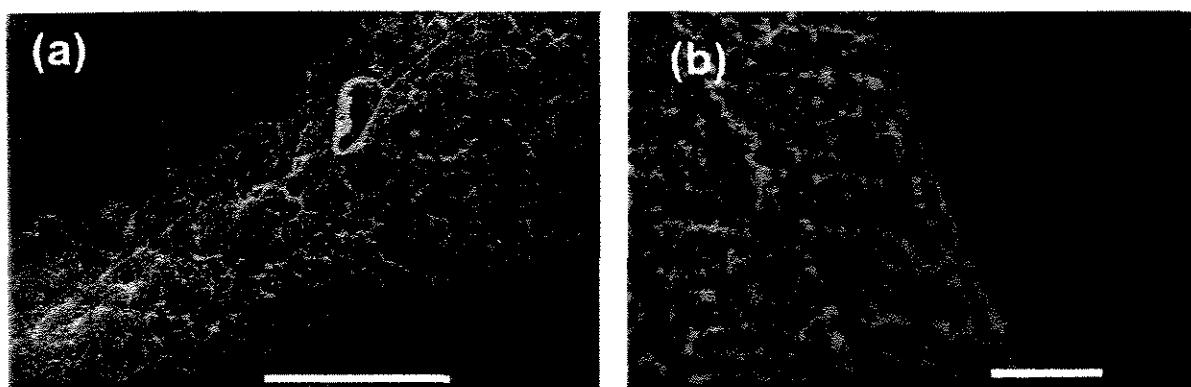


Figura 5.4.2.3.1-G: Micrografia eletrônica de varredura de membrana densa natural de quitosana com tensão/defeitos e pós-calcificação; barra(a) 100µm, (b) 10µm.

A figura 5.4.2.3.1-F mostra que, com uma deposição mais evoluída de fase mineral sobre a quitosana porosa (a) a pH=7,8, acaba-se formando uma camada lisa (inicialmente composta pela mesma formação esferoidal vista anteriormente (b), mas com um aspecto de "lama seca").

Isso mostra que a formação mineral muito provavelmente é amorfa (fraturas a 90°) e apresenta uma morfologia muito diferente das fraturas da figura 5.4.2.3.1-E (d).

A amostra densa riscada mostra a tendência de localidades com defeitos ou tensionados apresentarem maior deposição de fase mineral (Figura 5.4.2.3.1-G).

5.4.2.4. Análises de P e Ca (EDS)

Na maioria dos filmes (membranas densas), havia deposição de sais de cálcio, porém, a quantificação por EDS não era passível de ser bem realizada devido à fina espessura da camada depositada. A técnica EDS tem uma capacidade de penetração da

ordem de 0,5 μm enquanto que a camada depositada, ou o diâmetro das partículas depositadas têm espessura muitas vezes menor.

Tabela 5.4.2.4-A: Relações Ca:P atômicas médias obtidas por EDS para a figura 5.4.2.3.1-B (reticulação branda).

Espécie	reticulada	não-reticulada
Membrana densa	1,84	1,65
Membrana porosa	1,84	1,70
Precipitado	2,01	

As relações Ca:P médias determinadas por EDS mostram valores muito próximos daqueles encontrados em apatitas. No entanto, nas amostras de quitosana reticuladas, a relação mostrou-se levemente mais alta, ou seja, a formação de apatitas mais ricas em cálcio. A deposição ocorre de modo diferente nos dois tipos de membrana, uma vez que os grupos expostos à solução na interface também diferem.

Tabela 5.4.2.4-B: Relações Ca:P atômicas médias obtidas por EDS para reticulação severa (experimentos de curto prazo).

porosidade	reticulação	PAA	Ca alto	P alto	pH	Ca:P atômico
denso	não	não	não	não	7,8	1,65
denso	não	não	não	sim	7,8	1,58
denso	não	não	sim	não	7,8	1,70
denso	não	sim	não	não	7,4	1,69
denso	sim	não	não	não	7,8	1,84
denso	sim	não	não	sim	7,8	1,74
denso	sim	não	sim	não	7,8	2,08
denso	sim	sim	não	não	7,4	1,91
poroso	não	não	não	não	7,8	1,67
poroso	não	não	não	sim	7,8	1,46
poroso	não	não	sim	não	7,8	1,73
poroso	não	sim	não	não	7,4	2,46
poroso	sim	não	não	não	7,8	1,84
poroso	sim	sim	não	não	7,4	1,86

Através da análise fatorial, obtivemos os resultados apresentados na tabela 5.4.2.4-C.

Tabela 5.4.2.4-C: Efeitos da porosidade, reticulação, PAA, e concentração de Ca e P na relação Ca:P dos depósitos.

Fatores	Efeitos
Porosidade	0,06
Reticulação	4,72
PAA	0,12
[Ca] alto	4,76
[P] alto	-0,08
Porosidade x reticulação	-0,11
Porosidade x PAA	0,09
Porosidade x Ca	0,00
Porosidade x P	-0,04
Reticulação x PAA	-0,09
Reticulação x Ca	4,73
Reticulação x P	-0,01
Porosidade x reticulação x PAA	-0,10

As demais influências (interações) não são possíveis de calcular devido ao modelo adotado.

Verifica-se que os principais fatores que influenciam na composição (razão Ca:P) são a reticulação com glutaraldeído e a concentração de Ca no meio calcificante.

Note que estes efeitos são sobre a composição, e não sobre o grau (quantidade) de calcificação. Quanto ao grau de cobertura dos depósitos, não realizamos a quantificação, mas as observações das micrografias de varredura, juntamente com os resultados de não calcificação a baixo pH (7,2), mostram que o pH, a reticulação, assim como a porosidade alta e a adsorção de PAA, são fatores importantes na influência do grau de deposição: quanto mais baixo o pH, menor era o grau de deposição. A reticulação com glutaraldeído e a falta de porosidade inibem a deposição sobre a quitosana. A comparação entre as deposições a pH 7,4, mostra que a presença de PAA permite uma deposição de fase mineral mais intensa do que em sua ausência.

5.4.2.5. Titulação potenciométrica da quitosana calcificada

Os resultados da titulação potenciométrica estão mostrados na tabela 5.4.2.5-A.

Tabela 5.4.2.5-A: Resultados de titulação potenciométrica da quitosana calcificada.

	Massa úmida	Massa seca	Milimoles de quitosana	Milimoles de NaOH	% grupos protonáveis
7,8 PN	0,5943 g	71,31 mg	0,443	0,18	40,63
7,8 PR	1,0518 g	84,14 mg	0,523	0,14	26,79
Ca PN	0,6241 g	74,89 mg	0,465	0,17	36,54
Ca PR	0,8454 g	67,63 mg	0,420	0,12	28,57
P PN	0,4679 g	56,15 mg	0,349	0,11	31,54
P PR	0,7622 g	60,98 mg	0,379	0,07	18,48
PAA PN	0,6862 g	82,34 mg	0,511	0,17	33,24
PAA PR	0,9046 g	72,37 mg	0,449	0,13	28,92

Os gráficos de titulação potenciométricas referentes a essa tabela estão na figura 5.4.2.5-A e na figura 5.4.2.5-B.

Observa-se que após a calcificação, a quantidade de grupos protonáveis (provavelmente amino) decai muito, ou seja, a calcificação indisponibiliza os grupos protonáveis. A [P] alta, há um maior bloqueio, o que pode ser justificado pela figura 5.4.2.3.1-C, onde se vê um maior contato dos depósitos com a matriz.

Com as amostras com PAA nota-se fenômeno parecido, já que a adsorção com PAA, aumentava a quantidade de grupos tituláveis por NaOH.

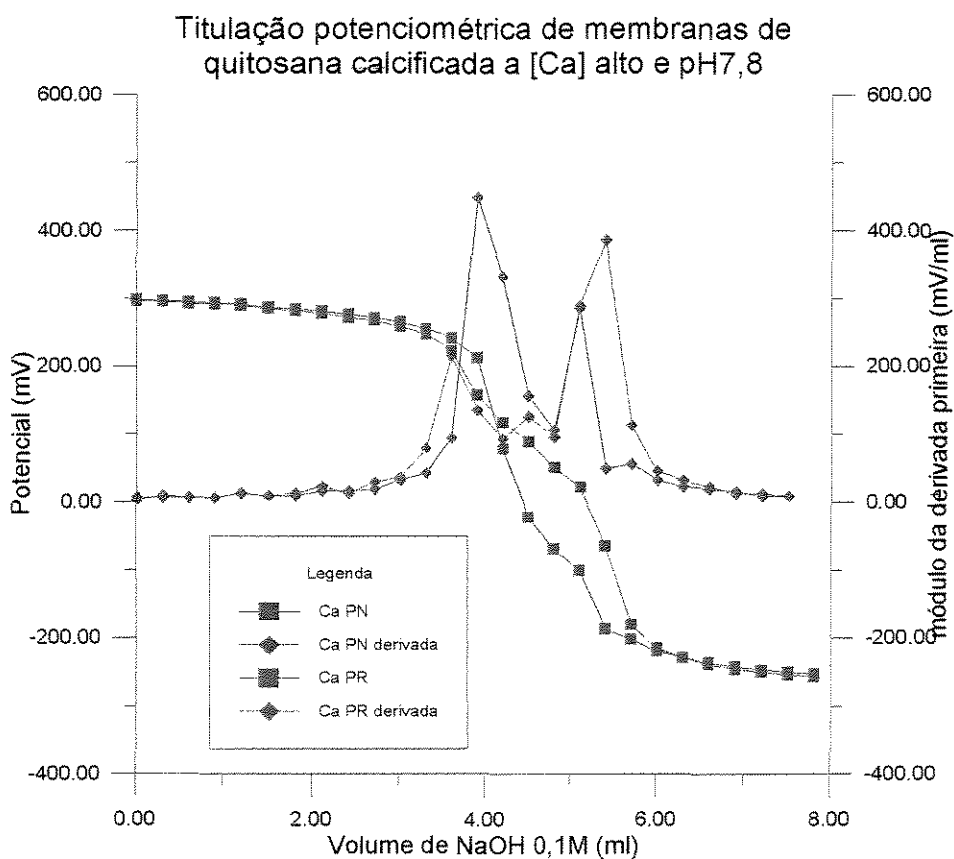
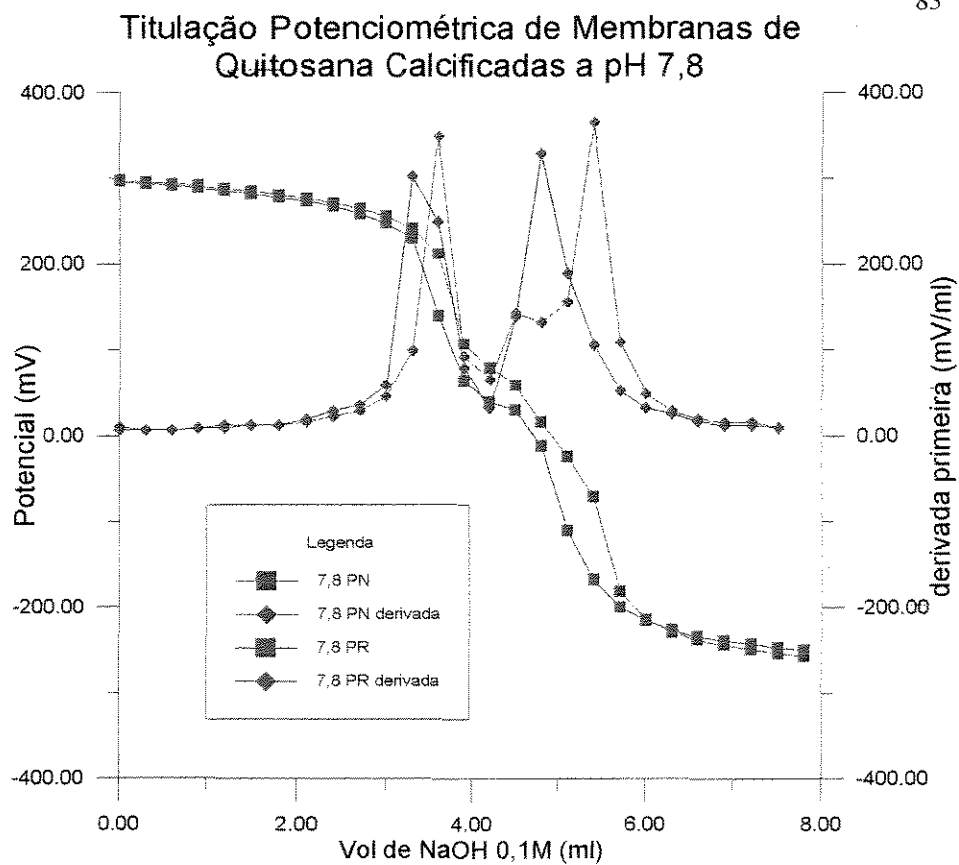


Figura 5.4.2.5-A: Curvas de titulação potenciométrica de membranas porosas de quitosana a pH 7,8 (em cima) e a [Ca] alto e pH 7,8 (em baixo)

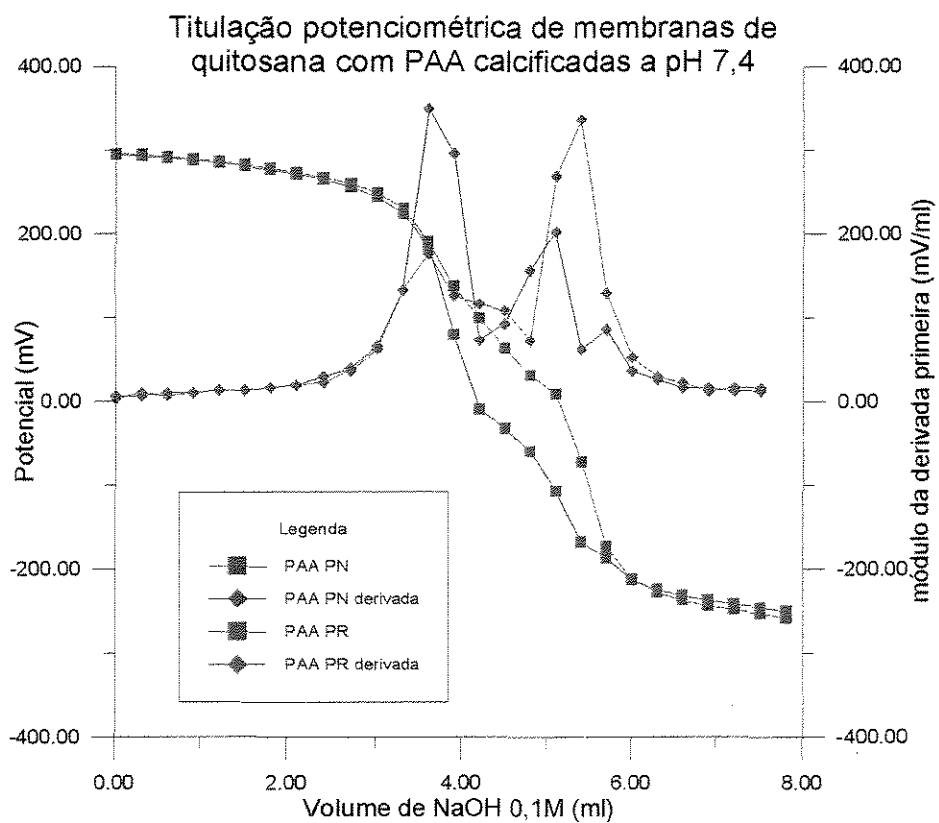
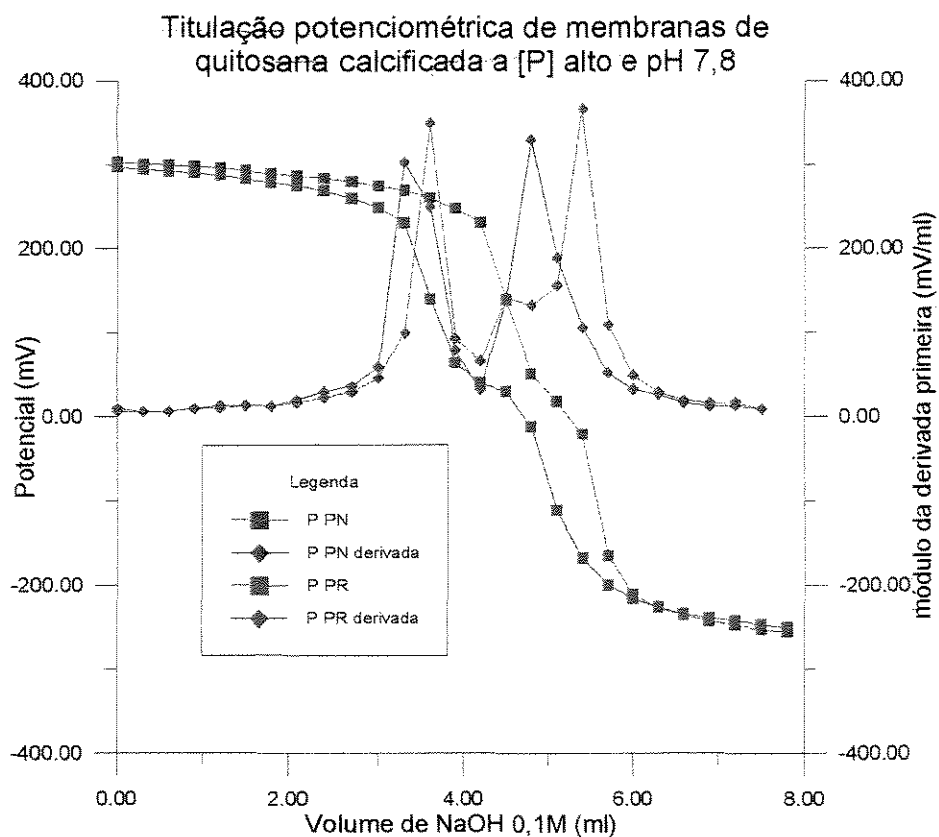


Figura 5.4.2.5-B: Titulação potenciométrica de membranas calcificadas de quitosana a [P] alto (em cima) e com PAA a pH 7,4 (em baixo)

5.4.1.1. Espectroscopia de IV

Nas figuras 5.4.1.1-B e C, apresentam-se os espectros de infra-vermelho de filmes de quitosana naturais e reticulados, respectivamente, após calcificação. Para referência, graficamos (figura 5.4.1.1-A) os espectros de filmes secos de quitosana após secagem, em cada etapa de fabricação e tratamento dos substratos.

Obtenção dos filmes de quitosana:

Na figura 5.4.1.1-A (a), observa-se que a quitosana natural (seca neutralizada) apresenta as seguintes bandas:

- 3450 cm^{-1} : estiramento O-H;
- 1650 cm^{-1} : correspondente a amida I;
- 1560 cm^{-1} : relacionada a amida II;
- 1314 cm^{-1} : grupo -CO-N-;
- 1070 cm^{-1} e 1030 cm^{-1} : estiramento C-O;
- 800 e 1200 cm^{-1} está relacionada com os anéis piranosídicos.

Quando a quitosana ainda não tinha sido neutralizada em banho de solução de NaOH (quitosana seca protonada), o espectro apresentou grandes absorções em 1628 e 1520 cm^{-1} indicando-se a presença de grupos NH_3^+ .

O processo de reticulação com glutaraldeído, por sua vez, apresenta algumas variações (Monteiro e Airolti, 1999):

- Sensível aumento da absorção a 1655 cm^{-1} : ligação imino N=C;
- Ombro a 1562 cm^{-1} : ligação etilênica C=C;
- Ombro a 1720 cm^{-1} : ligação aldeídica livre;
- Sensível aumento a 2936 cm^{-1} : estiramento C-H ;
- Diferença sensível de intensidade a $\sim 1100 \text{ cm}^{-1}$, típica de amina alifática, indicando uma indisponibilização dos grupos característicos (amino) com o glutaraldeído. Isto torna a membrana mais hidrofóbica (concordando com os resultados de absorção de água).

Quitosana tratada com PAA:

A quitosana tratada com PAA passa a mostrar absorções a: 1700 cm^{-1} devido ao estiramento do grupo carboxílico C=O; 1400 cm^{-1} devido à presença de íon carboxilato e a 1550 cm^{-1} devido à presença de amina protonada. A interação entre PAA e quitosana deve ser puramente eletrostática, envolvendo os grupos - NH_3^+ da quitosana e - COO^- do PAA. Resultado similar (Wang et alli, 1997) já foi mencionado por outros autores na literatura.

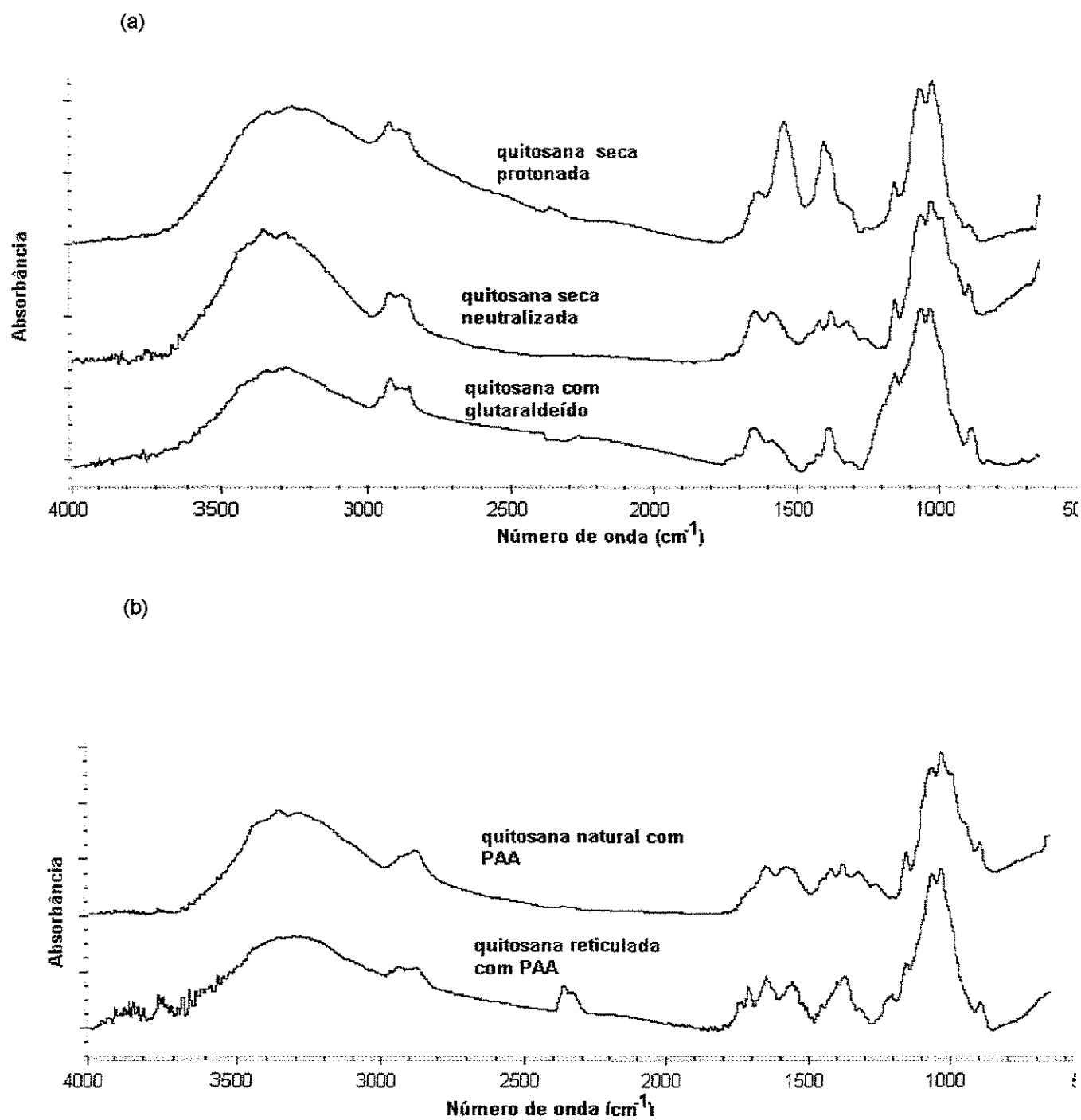


Figura 5.4.1.1-A: Espectros de infra-vermelho (IV) de filmes secos de quitosana (a) em etapas da preparação dos filmes e reticulação com glutaraldeído e (b) em após adsorção com PAA.

Quitosana com calcificação

O espectro mostrado nas figuras 5.4.1.1-B e C indicam que a calcificação chegou a "blindar" parte dos grupos iniciais da quitosana na superfície do filme, já que as absorções devido ao grupo amino não são mais evidenciadas (vale lembrar que o acessório ATR nos permite identificar absorções dos grupos da superfície do material).

Em geral, em ambas as figuras (5.4.1.1-B e C), as amostras tratadas a pH 7,2, mostram pouca variação em relação a amostra não calcificada. Há apenas um aumento sensível na absorção a 1650 cm^{-1} , evidenciando, possivelmente, amida I. A microscopia mostra que a esse pH, a calcificação praticamente não ocorre.

A pH's mais altos, 7,4 e 7,8, passam a preponderar absorções típicas de fosfato (como os encontrados em fosfato de cálcio amorfo): presença de fosfato de cálcio com a larga banda entre 1200 e 1000 cm^{-1} devido à deformação anti-simétrica do grupo PO_3 e ao estiramento do grupo PO_4^{3-} ($\nu\text{ P-O}$) (Nakamoto, 1978). Entre 800 e 900 cm^{-1} há uma banda similar a do ortofosfato de cálcio dibásico que pode ser devido ao estiramento de P-O-Ca (Nyquist e Kagel, 1971). E, em fosfatos pouco cristalizados há também sinais a 1125 e 1110 cm^{-1} .

A literatura (Elliot, 1994) diz que o espectro de IV de fosfato de cálcio amorfo (ACPs) apresenta bandas largas e disformes de absorção, conforme as observadas neste trabalho. Tal característica é esperada para materiais amorfos pois os íons não estão sujeitos a distorções regulares que eles sofreriam se estivessem num retículo cristalino. Todavia, alguma leve estrutura nas bandas de fosfato pode ser vista entre 1250 e 890 cm^{-1} . Os sinais ν_3 e ν_4 de PO_4 ocorrem em 1085 e 555 cm^{-1} , respectivamente.

Nas condições em que houve calcificação (especialmente em condições a concentrações $[\text{Ca}]$ alto, a $\text{pH}=7,8$, e calcificada com PAA) nota-se uma contribuição adicional à já existente devido ao íon PO_4^{3-} , devido ao estiramento assimétrico de CO_3^{2-} , próximo a 1500 cm^{-1} , 1700 cm^{-1} e em 875 cm^{-1} (as bandas de HPO_4^{2-} ocorrem perto de 862 cm^{-1}).

Para a calcificação a $[\text{P}]$ alto, o espectro de IV assemelha-se à da HA com deficiência de cálcio (que é, por sua vez, similar ao de HA estequiométrico) tendo como diferença, a adição de bandas de HPO_4^{2-} . Em apatitas com $\text{Ca/P} = 1,5-1,6$, três bandas adicionais são identificadas: uma banda fraca a 1210 cm^{-1} de δ_{OH} do íon HPO_4^{2-} , um fraco ombro a 1130 cm^{-1} da vibração ν_3 de HPO_4^{2-} , e uma banda a 870 cm^{-1} do modo P-OH ν_5 HPO_4^{2-} (Elliot, 1994).

HPO_4^{2-} deve estar presente nos depósitos, pois: 1) no pH reacional, parte do PO_4^{3-} encontra-se protonado; 2) o material de partida (Na_2HPO_4) é composto por estes íons.

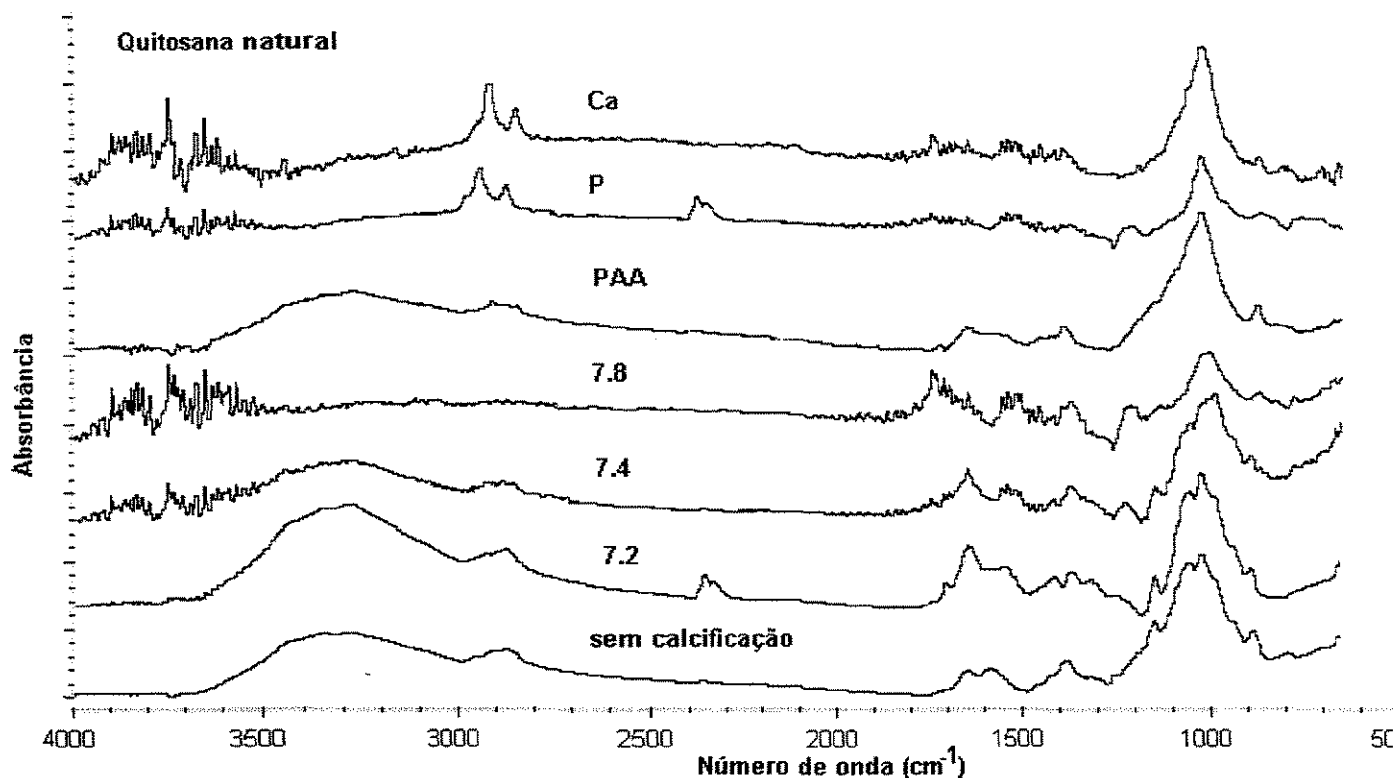


Figura 5.4.1.1-B: espectro de infra-vermelho de filmes secos de quitosana reticulada, calcificadas a diversas condições.

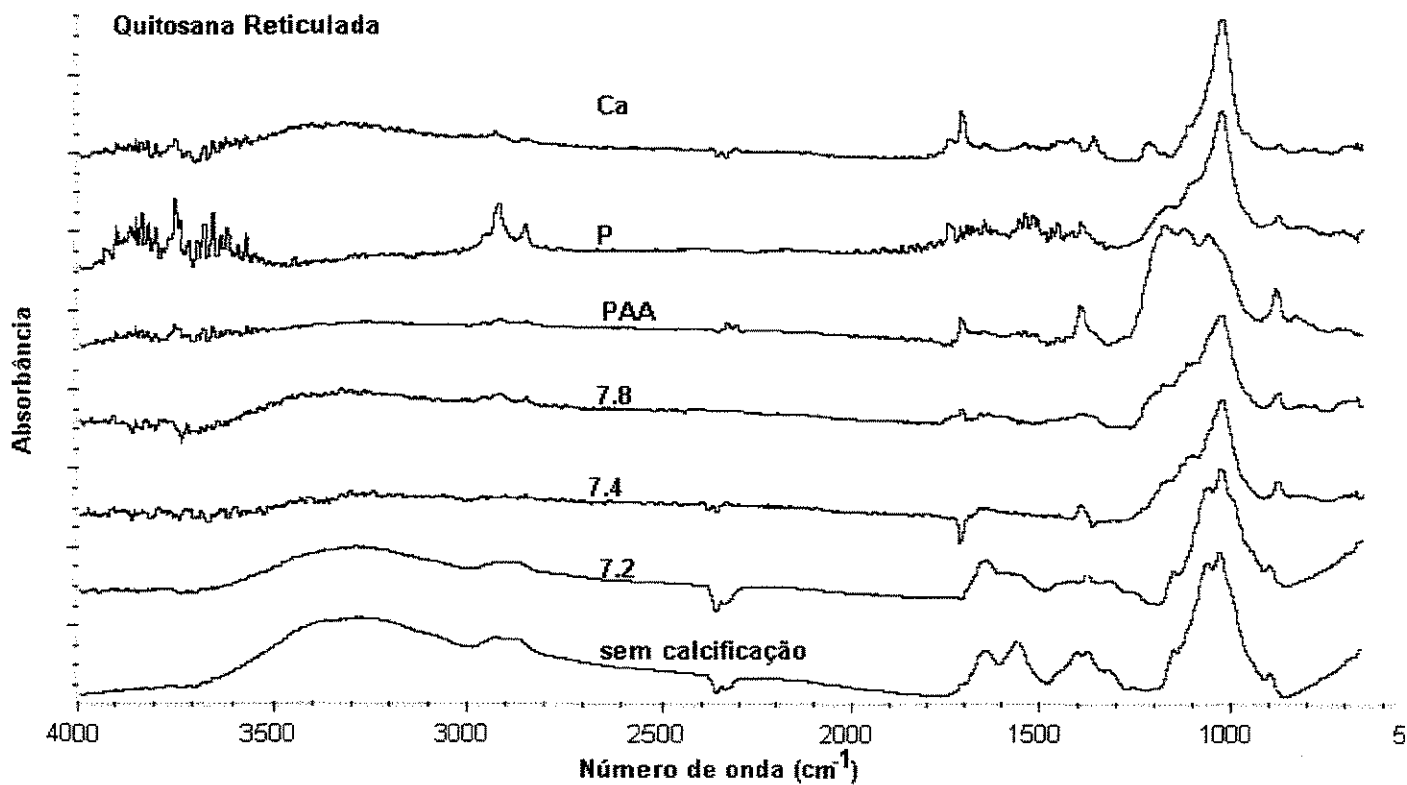


Figura 5.4.1.1-C: espectro de infra-vermelho de filmes secos de quitosana reticulada, calcificadas a diversas condições.

5.4.1.2. Difratometria de RX

5.4.1.2.1. Cristalinidade da quitosana

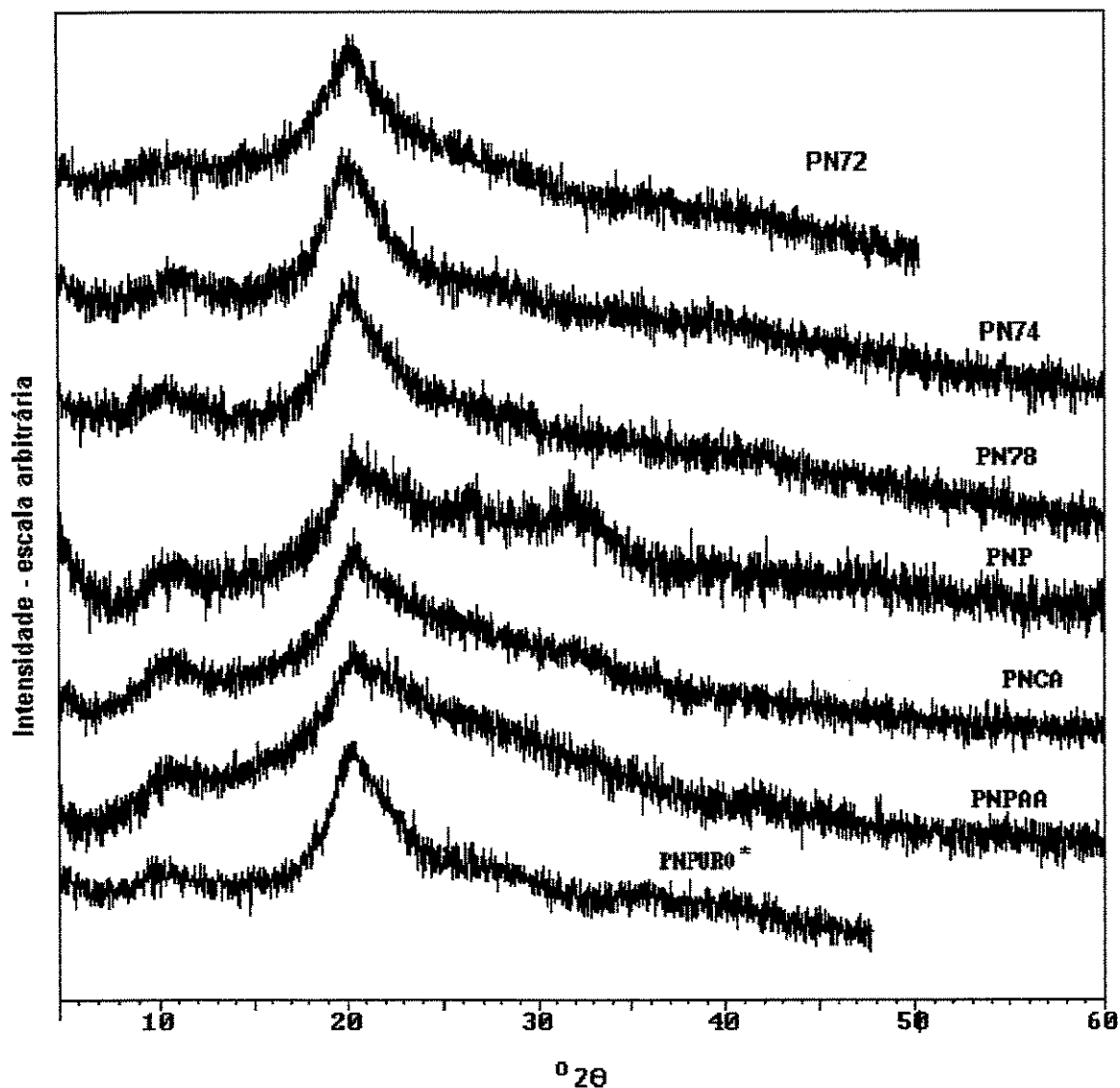


Figura 5.4.1.2.1-A: Difrátograma de RX de amostras porosas e naturais de quitosana.
* amostra não calcificada.

Legenda das amostras usadas nos difratogramas de RX:

Duas primeiras letras: PN - membrana porosa natural;

PR- membrana porosa reticulada com glutaraldeído;

FN- membrana densa (filme) natural;

FR- membrana densa (filme) reticulada com glutaraldeído).

As demais letras: PURO- sem calcificação;

PAA- com PAA, calcificada;
 Ca- calcificada a [Ca] alta;
 P- calcificada a [P] alta;
 7.8- calcificada a pH 7,8;
 7.4- calcificada a pH 7,4;
 7,2- calcificada a pH 7,2.

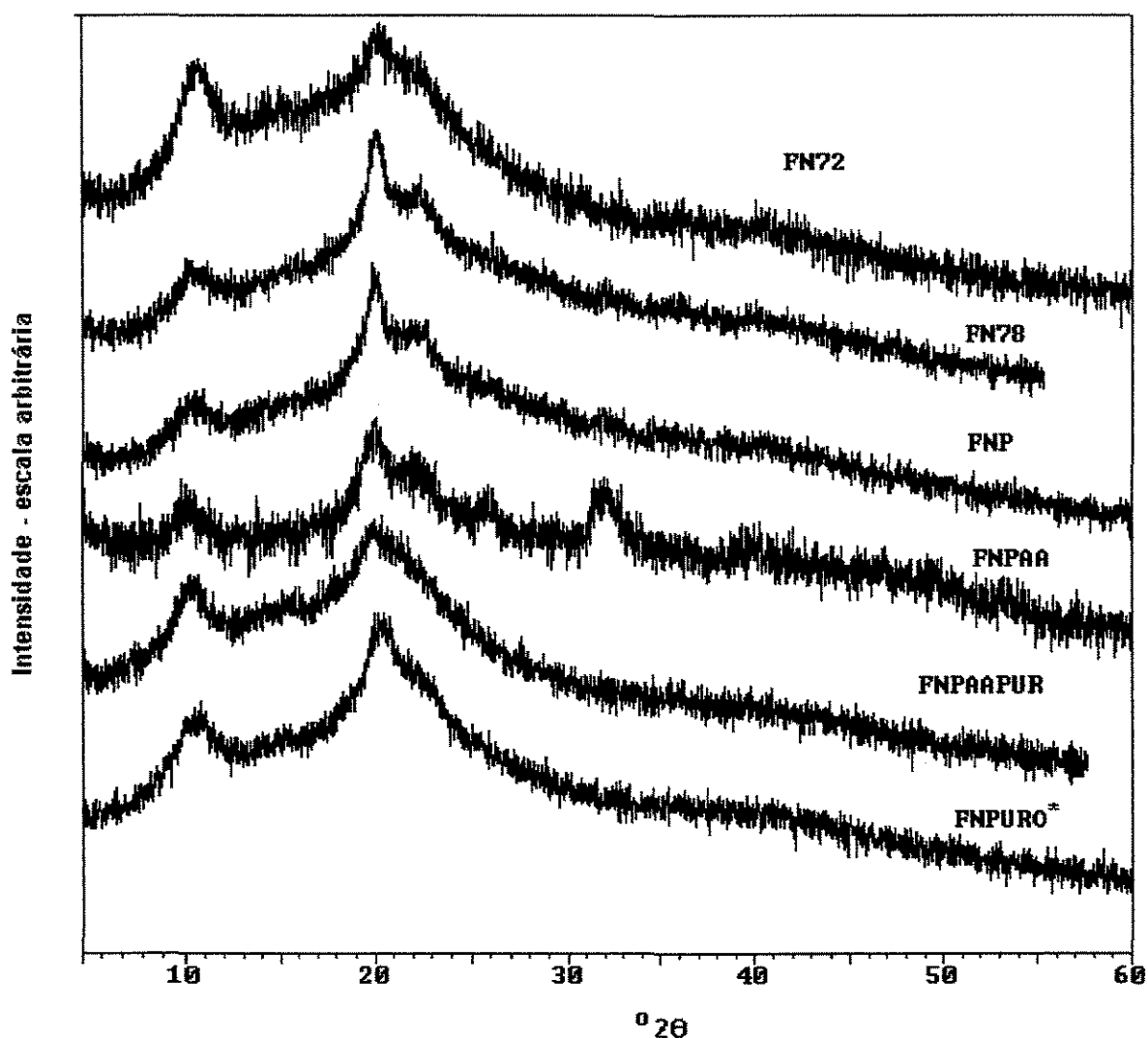


Figura 5.4.1.2.1-B: Difratoograma de RX de amostras densas e naturais de quitosana.
 * amostra não calcificada.

A literatura (Saito et alli, 1987; Ogawa et alli, 1984) mostra que a quitosana possui um arranjo atômico similar ao da quitina. O difratograma de RX da quitosana de casca de caranguejo apresentam normalmente picos a $2\theta = 10,4^\circ$, $19,6^\circ$ e $21,4^\circ$ que correspondem às reflexões (200), (020), e (220) e (202). Foi postulado, em estudos anteriores, que as moléculas de água estão fracamente ligadas entre as cadeias de quitosana ao longo da

direção (010). Em amostras tratadas termicamente, além do desaparecimento da reflexão (020), há um surgimento de um pico a $15,1^\circ\text{C}$ que corresponde à reflexão (120). O pico na posição (020) depende da quantidade de água e tende a diminuir em amostras secas ou tratadas termicamente a temperaturas mais altas (por exemplo, 200°C).

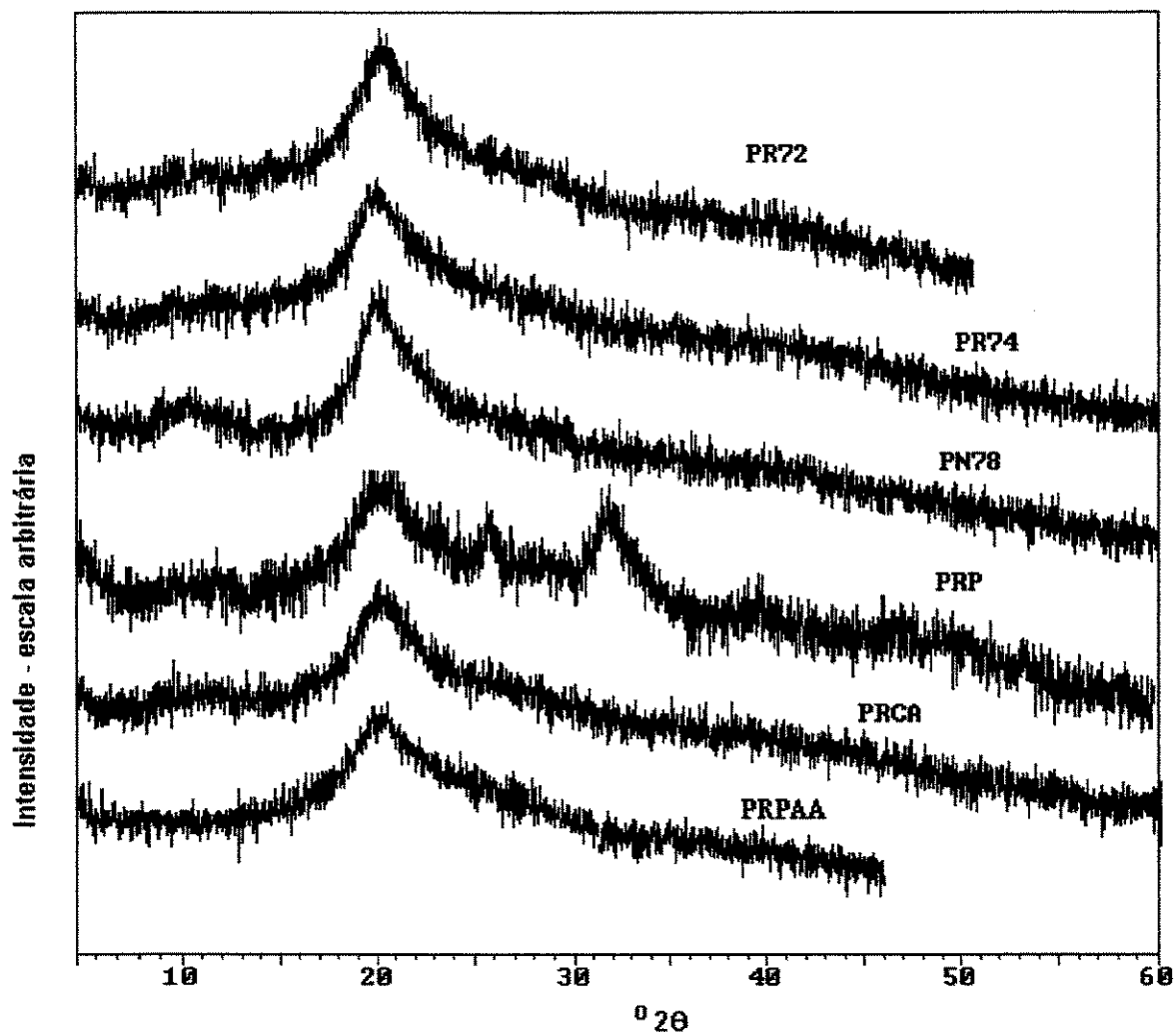


Figura 5.4.1.2.1-C: Difratoograma de RX de amostras porosas e reticuladas de quitosana.

Nos gráficos 5.4.1.2.1-A, B, C e D, o filme de quitosana natural mostra picos conforme mostrados na literatura, com a presença de reflexão a (020). No entanto, o tratamento com glutaraldeído extingue tal sinal, o que demonstra que há uma tendência da reticulação tornar a quitosana mais hidrofóbica ou ainda, inserir grupos diferentes entre suas fibras ou cadeias.

As membranas porosas apresentam-se menos cristalinas que os filmes, devido ao fato de que o processo de obtenção da última engloba uma fase de tratamento térmico (a

cerca 60°C). Esta temperatura de tratamento deve ter permitido uma mobilidade maior das cadeias de quitosana, resultando em uma melhor auto-organização das mesmas durante a secagem do filme, do que durante a coagulação drástica com NaOH.

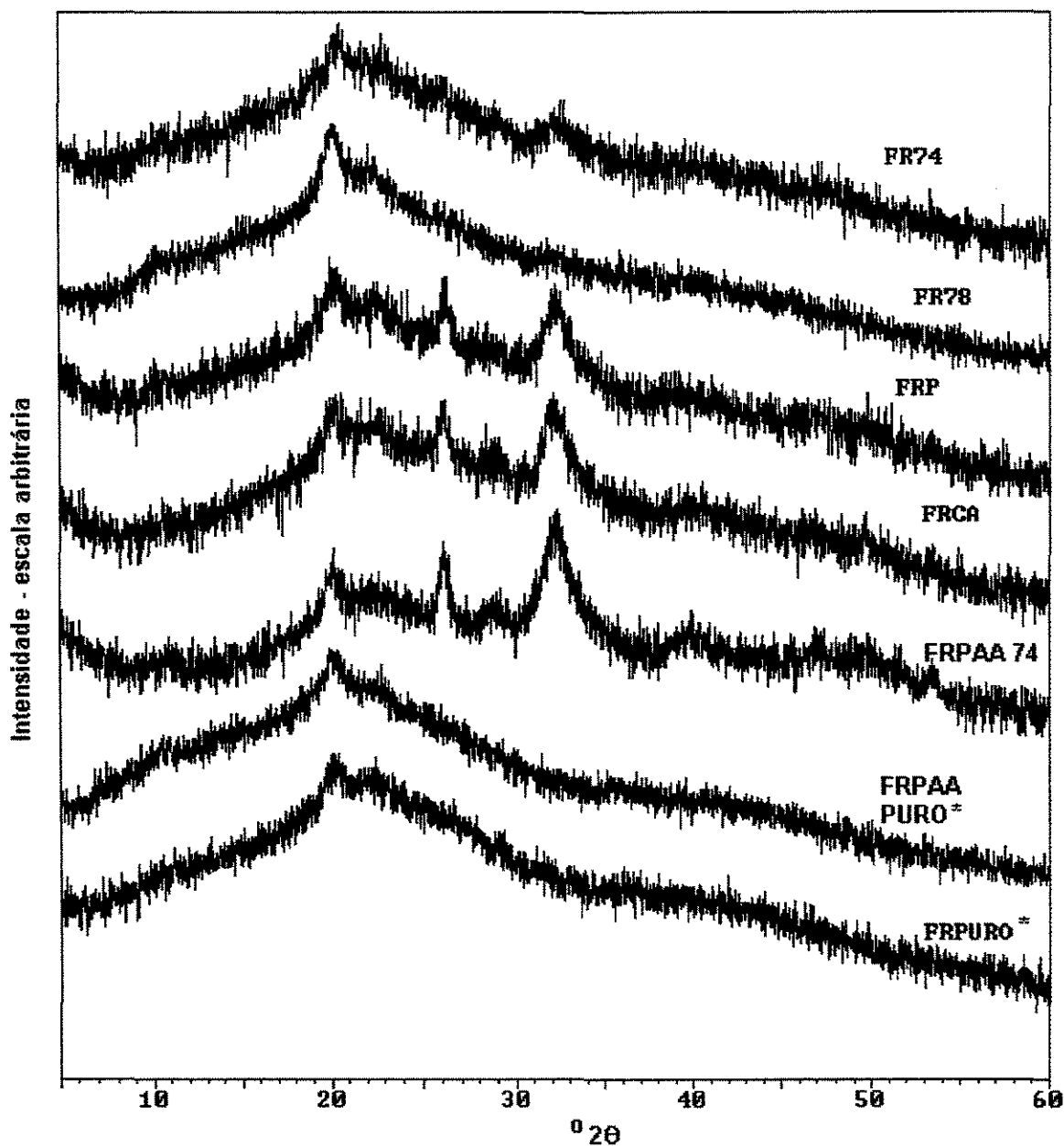


Figura 5.4.1.2.1-D: Difratoograma de RX de amostras densas e reticuladas de quitosana.
* amostras não calcificadas.

Os difratogramas indicam que a calcificação não necessariamente extingue os picos referentes ao plano (020), pois como se sabe, os sais de quitosana podem apresentar uma quantidade de água com posições e quantidades que dependem dos

ânions que se inserem entre as cadeias de quitosana e que o podem fazer de maneira irregular (Ogawa et alli, 1984).

Algumas amostras como PRP, todas as membranas densas e reticuladas (FR's), FN78, FNtensão, FNP e FNPAAs; apresentam o pico a $22-23^\circ$ (202), característico da quitosana tratada termicamente (Ogawa et alli, 1984), devido à provável remoção de água da estrutura do cristal. A calcificação, mais intensa em filmes naturais deve ter água deslocada por íons da solução calcificante (diminuição de (020) e aumento de (202)). O que realmente ocorre nos filmes naturais calcificados.

5.4.1.2.2. Cristalinidade dos depósitos de compostos de cálcio

Há um interesse comercial e acadêmico grande no desenvolvimento de biocerâmicas apatíticas, por isso, a cristalinidade de compostos de fosfato e cálcio é muito estudada na literatura.

Fosfato de cálcio amorfo (ACP) foi, junto com o fosfato octacálcio, um dos primeiros compostos de fósforo e cálcio relatados na literatura. Existe a possibilidade de que ACP seja constituída por estrutura apatítica, mas com um tamanho de cristal tão pequeno que assemelharia seu sinal a um material amorfo.

A hidroxiapatita (HA), por outro lado, é um mineral mais raro. O principal interesse sobre esse tipo de estrutura é como modelo para o componente inorgânico de ossos e dentes, apesar de que apatitas carbonatadas são provavelmente melhores representantes.

Um difratograma de RX de HA típico é mostrado na figura 5.4.1.2.2-A.

A definição dos graus de cristalinidade da HA diferem muito quando feitos por mineralogistas ou cristalografistas ou por biólogos ao tratar de apatitas orgânicas. Lerner e colaboradores (1991) propuseram em seu trabalho, uma sugestão para definir-se o grau de cristalinidade de acordo com a resolução dos picos da reflexão dos planos 211, 112, 300 e 202:

1. Nenhum pico: considerado fase amorfa;
2. Pico muito largo contendo todas as reflexões mencionadas e a reflexão do plano 002;
3. Aparência de picos de todos os planos mencionados, definidos grosseiramente e algumas fracas indicações das reflexões 210 e 102;
4. Apatita relativamente bem cristalizada.

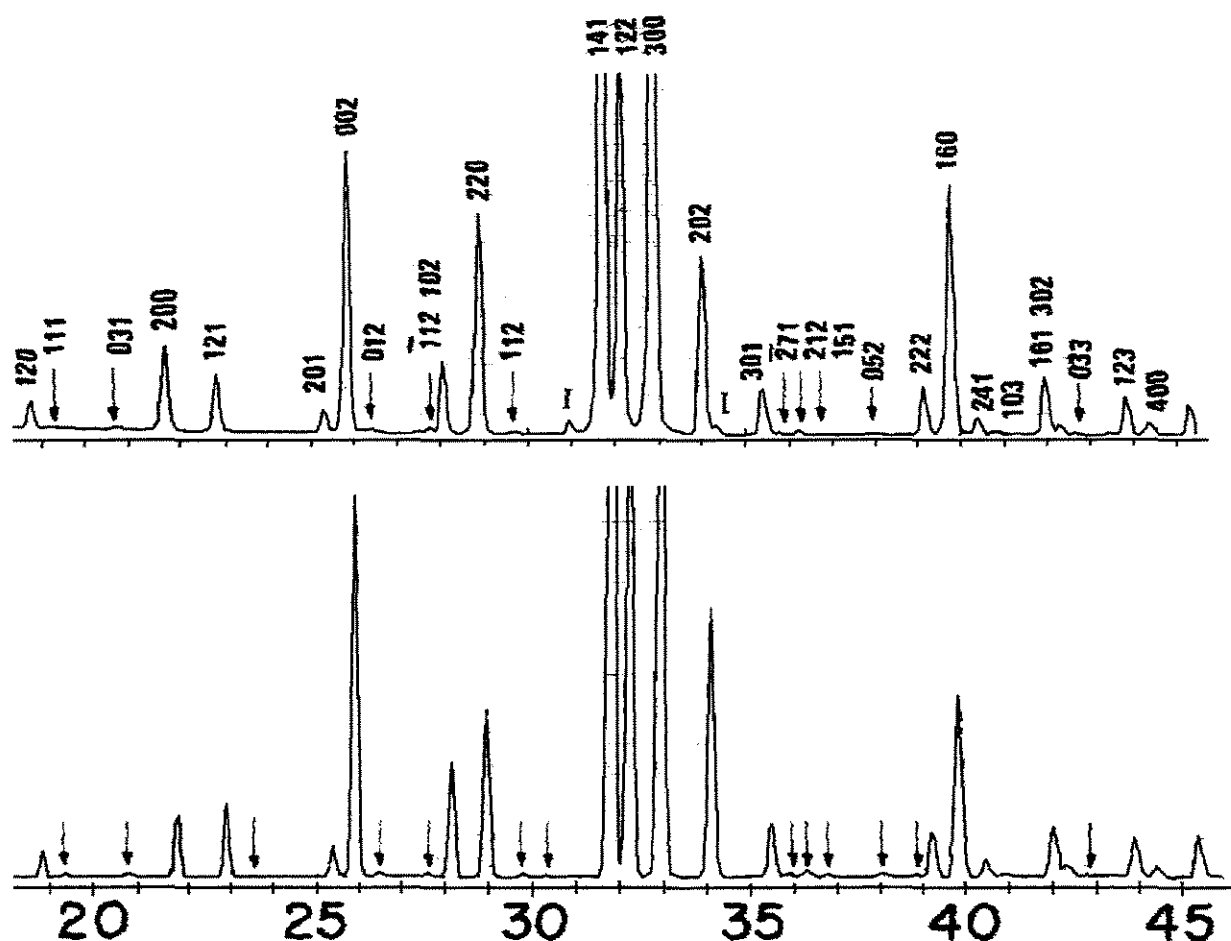


Figura 5.4.1.2.2-A: Difratogramas de RX observado (em cima) e calculado (em baixo) de hidroxiapatita monoclinica obtido por aquecimento de apatita clorada a 100°C. Linhas I são impurezas de β -tricalcio fosfato. A escala horizontal é grau 2θ (Elliot, 1994).

Aplicando-se essa classificação, temos:

- Grau 3: FRPAA74, FRCa;
- Grau 2: FRP, FR74, PNP, FNPA, PRP;
- Grau 1: FR78, FRPAAPURO, FRPURO, PR72, PR74, PN78, PNCA, PNPA, PNPURO, FN72, FN78, FNTENSAO, FNP, FNPAAPURO, FNPURO, PRPURO, PR74, PN78, PRCA, PRPA;

Há influência da quantidade de calcificação e sua regularidade na superfície de quitosana na intensidade do sinal de intensidade de difração de RX, porém, em geral, nota-se que os filmes reticulados, com PAA, e com Ca ou P alto propiciam formação de apatitas mais cristalinas. Os FN's e PN's mostram influência maior de grupos que podem ajudar a precipitar apatitas, porém não necessariamente cristalinas, já que os grupos da

quitosana, não sendo propícios ao crescimento epitaxial dos cristais, influenciam negativamente na cristalinidade dos substratos. Entre as membranas porosas, naturalmente menos cristalinas, há maior tendência de formar apatitas cristalinas em condições com excesso de P, e comparando-se F e P, há maior tendência de haver melhor cristalinidade nos depósitos de F, principalmente nos FR. Nos filmes densos naturais (FN), há maior cristalinidade após calcificação, em amostras tratadas com PAA. Tanto para FN ou FR, o tratamento com PAA melhora a cristalinidade, mostrando que os terminais carboxílicos são bons nucleadores de apatitas mais cristalinas. Em FR, diferentemente de FN, os níveis mais altos de Ca ou P já promovem a formação de apatitas mais cristalinas também.

Nas amostras calcificadas nota-se algum sinal de apatita ($\sim 26^\circ$ e $\sim 31^\circ$) (JCPDS, 1988). As bandas mal resolvidas, podem ser atribuídas ao tamanho de cristal muito pequeno (quando existem).

5.4.1.3. Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica da amostra de quitosana natural porosa calcificada a pH 7,8 está mostrada na figura 5.4.2.8-A.

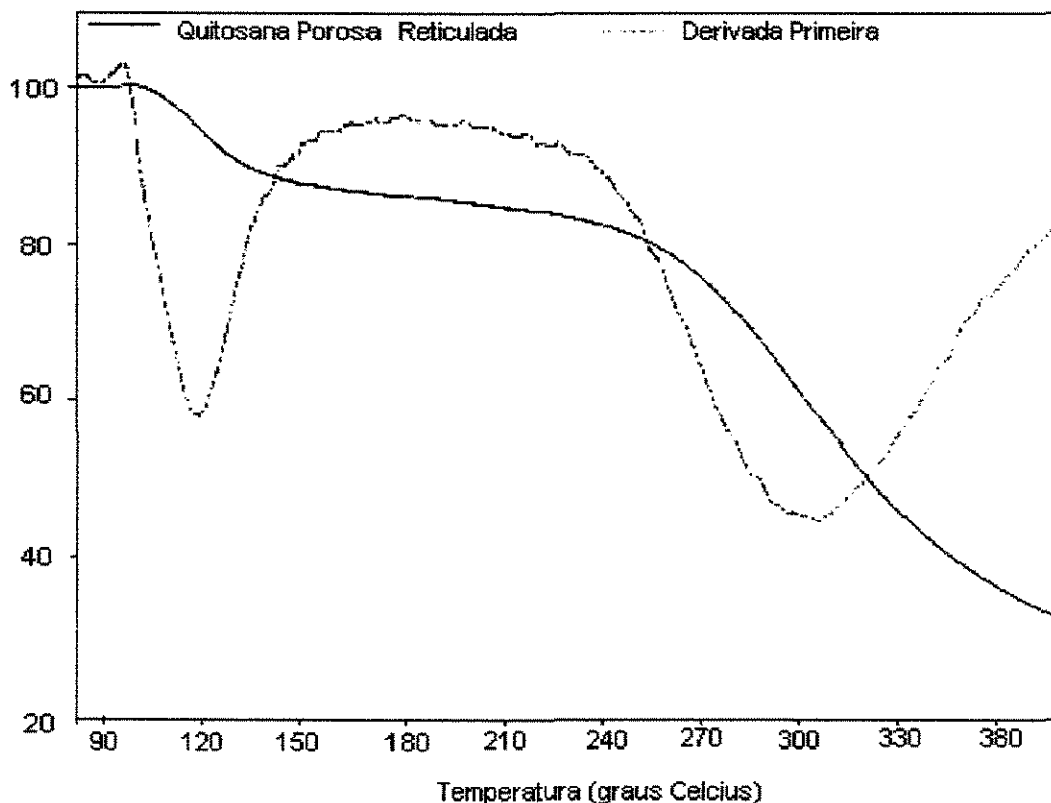


Figura 5.4.2.8-A: Curva de ATG da amostra PR calcificada a pH 7,8.

Nota-se que a curva acima é muito mais próxima da curva de TGA da amostra de quitosana porosa reticulada com glutaraldeído. Esse resultado está de acordo, já que a calcificação sobre a quitosana promove interações com os grupos da matriz, blindando seus grupos hidrofílicos que então, terão menor capacidade de demonstrar essa característica. Logo a absorção de umidade, será muito menor e a liberação de voláteis se dará a uma temperatura menor que na quitosana natural.

5.4.1.4. Microscopia de força atômica

A figura 5.4.1.4-A mostra que a calcificação promove, em seus estágios iniciais, a formação de estruturas pontiagudas, que podem indicar a presença dos depósitos.

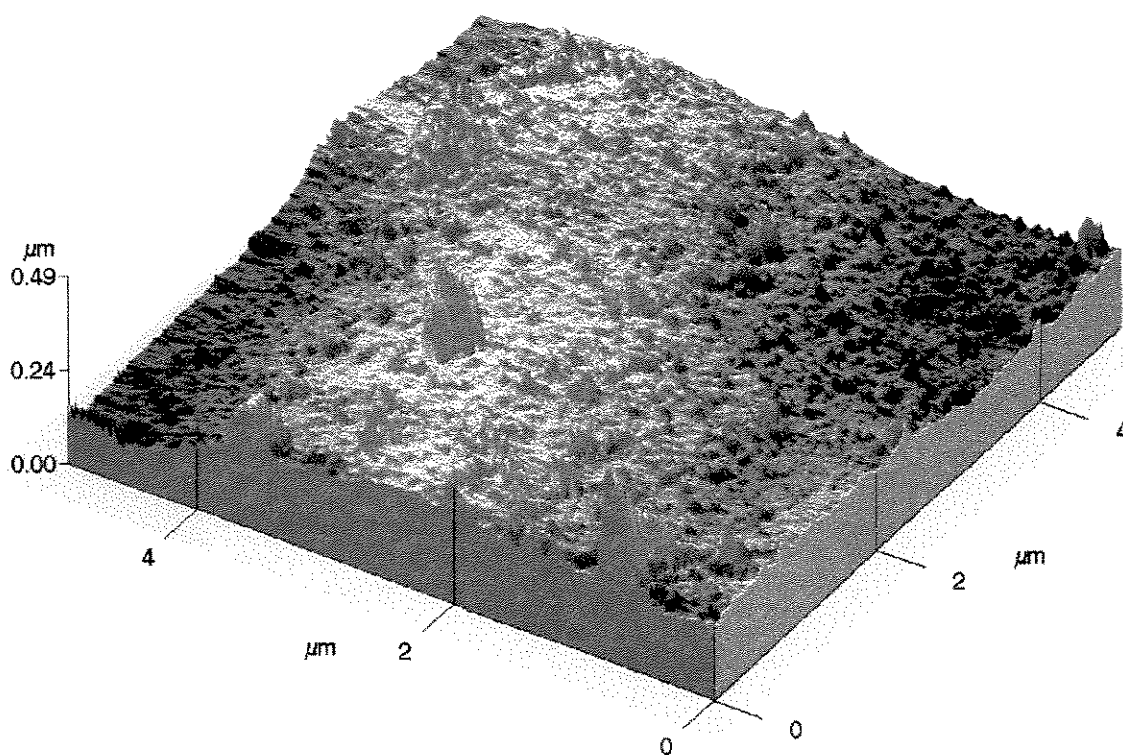


Figura 5.4.1.4-A: Micrografia de força atômica de filme seco de quitosana após imersão durante 7 dias em FCS a pH 7,4.

5.5. Ensaios de adsorção de proteína em quitosana calcificada

Conforme citado anteriormente, a adsorção de proteínas em HA mostra muita similaridade com a cromatografia de troca iônica. Apesar dos depósitos calcificados neste trabalho não serem necessariamente HA, a análise da natureza das interações com proteínas foi interpretada a partir de modelos similares aos obtidos a partir de casos de adsorção em HA da literatura.

Sabe-se que a estrutura de HA exhibe dois tipos de sítios de adsorção: um positivo (+) e que é constituído de um ou mais íons cálcio (Ca^{++}) do cristal, tendo a função de um trocador de ânions, chamado de sítio C; outro negativo (-), constituído pelos íons fosfato (PO_4^{3-}), funcionando como um trocador de cátions, chamado de sítio P.

Dessa forma, uma molécula protéica pode ser adsorvida de duas maneiras diferentes: nos sítios C (+) através dos resíduos de aminoácidos com grupos carboxílicos (e/ou fosfatos, no caso de fosfoproteínas) negativos e em sítios P (-), utilizando-se dos grupos amino ou guanidinila dos resíduos de aminoácidos. Em sistemas reais tem se notado, que a distribuição está sempre voltada a um dos dois extremos: ou as moléculas ácidas (-) com pI menor que 7 são adsorvidas principalmente nos sítios C, enquanto que as básicas (+) pI maior que 7, nos sítios P. Existe também uma influência do íon cálcio que possui uma capacidade especial de reforçar a ligação aos grupos carboxilas nos sítios C, já que todas as proteínas ácidas são retidas na coluna mesmo na presença de 3M de CaCl_2 .

Os cristais de HA podem ser representados por uma unidade de célula contendo os vetores **a**, **b** e **c**, conforme mostrado na figura 5.5-A, onde o ângulo $\mathbf{a} \wedge \mathbf{b}$ é 120° , e $\mathbf{a} \wedge \mathbf{c}$ e $\mathbf{b} \wedge \mathbf{c}$ é 90° .

Uma célula unitária com a estequiometria ideal de cristal de HA apresenta dez íons cálcio, seis fosfatos e duas hidroxilas, de modo que a razão molar Ca/P é 1,67. Pode-se, entretanto, encontrar-se vários tipos de partículas de HA usados para se empacotar uma coluna de HPLC (high-performance liquid chromatography):

- bastonetes hexagonais: representam um monocristal e um tipo de estrutura quase-ideal. A relação molar Ca/P é de 1,67, e a superfície de corte transversal corresponde à superfície (001), ou **c**, paralela ao plano (**a,b**). As seis demais superfícies, retangulares são as superfícies (100) ou (010), ou **a** e **b**, (com $\mathbf{a}=\mathbf{b}$). Nota-se que a superfície **c** é muito menor que **a**.

- Agulhas que se juntam para formar grãos de HA nas formas esferoidais: apresenta uma razão molar Ca/P de 1,52-1,54. Sua estrutura mostra que é muito provável que o eixo c seja paralelo ao eixo da agulha e que a maior parte da superfície exposta seja também do tipo a.

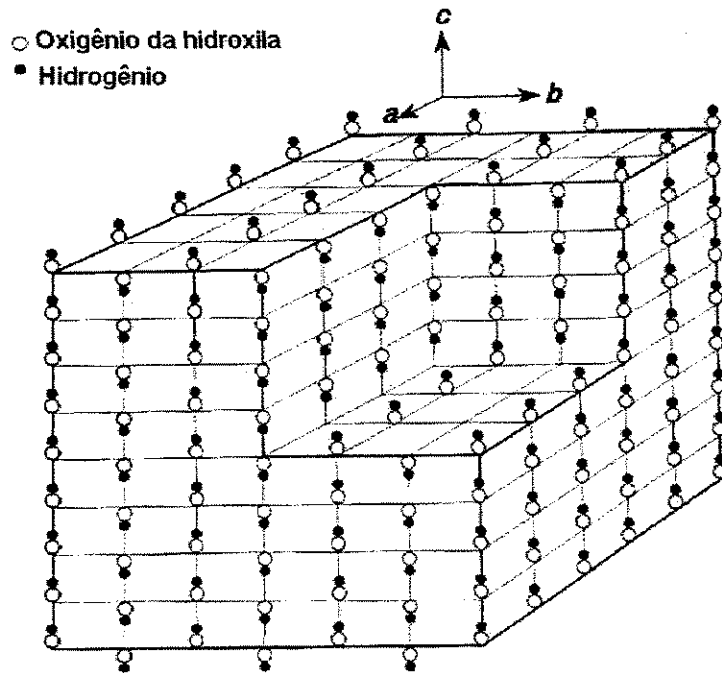


Figura 5.5-A: Esquema simplificado da estrutura cristalina da HA.

- Estruturas lamelares cuja estrutura externa assemelhava-se a uma rosa ("rose des sables": segundo os ensaios de difração de elétrons (Monma et alli, 1978) a superfície planar da lamela correspondia ao plano (100) ou a, ou seja, é muito provável que a superfície da rosa também consista, em sua maioria, de superfície a.

Quando um cristal de HA é suspenso em uma solução aquosa, as posições de hidroxilas na superfície do cristal (cada qual ligados por dois íons cálcio) estão vazias pelo menos por alguns instantes e os íons cálcio, com carga positiva, constituem sítios de adsorção. Ou seja, as superfícies a e b da HA, são sítios de adsorção tipo C, arranjados de maneira retangular. Esses sítios agem como trocador aniônico, onde íons fosfato (provenientes de um tampão fosfato, por exemplo), podem competir com um grupo fosfato ou carboxila de uma macromolécula para ocupar os espaços das hidroxilas.

O mecanismo de adsorção tanto de íons livres quanto de grupos de macromoléculas é que possibilita o crescimento epitaxial do cristal, o que explica a complexidade das fases minerais passíveis de serem construídas pelos fosfatos de cálcio.

Na superfície *c* da HA, por raciocínio similar, os sítios P estão arranjos de maneira hexagonal (caso as posições Ca^{++} fiquem vazias por algum instante, ancorados pelas cargas negativas dos oxigênios dos fosfatos do cristal).

Experimentos relatados na literatura, mostram que com HA de corais (bastonetes) ou esferoidais (agulhas), a adsorção de proteínas básicas como a lisozima é muito menor que a ocorrente com proteínas ácidas, como BSA, em sistemas com o tampão de 1mM KP (fosfato de potássio). Como já foi discutido, nesses dois tipos de HA, a área total da superfície *c* é muito menor que a *a* (onde a BSA é adsorvida). No entanto, nas HA com estrutura "rose des saïles", cujas lamelas consistem em superfície *a*, a adsorção de lisozima é muito comparável à quantidade de BSA adsorvida, o que aumenta a probabilidade de coexistência de outras estruturas diferentes das não-lamelares.

Utilizando-se um método similar ao comparado com lisozima e BSA, foi confirmado que outras proteínas neutras ou básicas, como mioglobina ($pI = 7$), tripsinogênio ($pI=9,3$), ribonuclease A ($pI=9,7$) e citocromo C ($pI= 9,8-10,0$) são adsorvidos principalmente na superfície *c*. Outras proteínas ácidas, como pepsinogênio ($pI=3,9$) e ovalbumina ($pI=4,6$) são adsorvidas principalmente na superfície *a*.

Dessa forma, é possível utilizar a adsorção de proteínas ácidas e básicas sobre uma matriz para identificar e/ou estimar a preponderância de superfícies do tipo *c* ou *a*.

Nos depósitos calcificados obtidos neste trabalho possivelmente há também sítios que podem ser tratados como **similares** aos *c* e *a* encontrados na HA.

5.5.1. Adsorção comparativa entre três proteínas

Tabela 5.5.1-A: Resultados preliminares comparando-se a matriz de quitosana natural e calcificada a pH 7,8.

Matriz	Capacidade de Adsorção		
	Inibidor de Tripsina (mg.g ⁻¹ resina úmida)	BSA (mg.g ⁻¹ resina úmida)	Citocromo C (mg.g ⁻¹ resina úmida)
Concentração inicial da solução (mg.mL ⁻¹)	0,804	0,808	0,692
Quitosana natural	0,6216	0,6372	0,1401
Quitosana Calcificada	1,3062	1,0339	0,2081
Aumento da calcificada	110%	98%	48%

Observa-se que as proteínas ácidas (BSA e IT) apresentam um aumento de adsorção na quitosana calcificada, maior que a observada para a proteína básica (citocromo C). Em pH 7,5 as proteínas ácidas estão preponderantemente com carga negativa (-), enquanto que a básica, com carga positiva (+) em alguma extensão. Isso pode nos dizer, que mesmo na quitosana pura com pI de 6,5 os grupos aminos básicos ($-NH_2$) e protonados ($-NH_3^+$), tendem a adsorver mais proteínas ácidas (quase uma ordem de grandeza na capacidade de adsorção). A calcificação aumentou a capacidade de adsorção da matriz, porém, aumentou mais para as proteínas ácidas, o que demonstra que as proteínas básicas apresentam uma capacidade de adsorção menor que as ácidas, levando à conclusão de que a área de adsorção exposta na matriz calcificada é constituída de sítios, possivelmente similares aos do tipo c das apatitas, em vez do tipo a.

Nas matrizes não calcificadas, provavelmente o processo de adsorção não envolve apenas cargas (vide item 5.5.2). Reticulações com glutaraldeído introduzem porções ou domínios hidrofóbicos, além dos grupos N-acetil da quitosana que possuem capacidade de associar-se por interações hidrofóbicas. No processo de desacetilação da quitina não se sabe como estes grupos estão dispostos se de modo heterogêneo ao longo da cadeia ou se em bolsões, constituindo regiões onde haverá forte interação hidrofóbica com espécies que possuam porções hidrofóbicas e proteínas, dependendo da sua constituição de aminoácidos (Agarwal et alli, 1995). Arruda (1999) realizou ensaios de adsorção com quitosana reticulada a várias razões molares, mostrando uma queda inicial seguida de um aumento no número de grupos protonáveis em função da concentração de glutaraldeído usada no tratamento. Entretanto, em todas as razões estudadas, obteve, em variadas extensões, interações hidrofóbicas.

Isto pode ser bem observado no gráfico 5.5.2-A onde se mostra a desorção de proteínas após adição de 1,0M NaCl.

A estruturação de cátions como o cálcio na superfície, pode aumentar a capacidade de adsorção de proteínas ácidas, conforme observadas na tabela 5.5.1-A, o que concorda com os dados de literatura.

A quitosana a $pH=7,5$ tem quase 90% de grupos não carregados ($-NH_2$) e somente 10% de grupos ($-NH_3^+$) portanto a adsorção deve ocorrer em função de cargas superficiais a partir do íon cálcio, o IT e BSA têm carga negativa a $pH 7,5$; enquanto que o citocromo C $pI 9,8-10$ tem mais cargas positivas. No entanto é difícil definir exatamente a contribuição das porções hidrofóbicas por N-acetil da quitosana (15%).

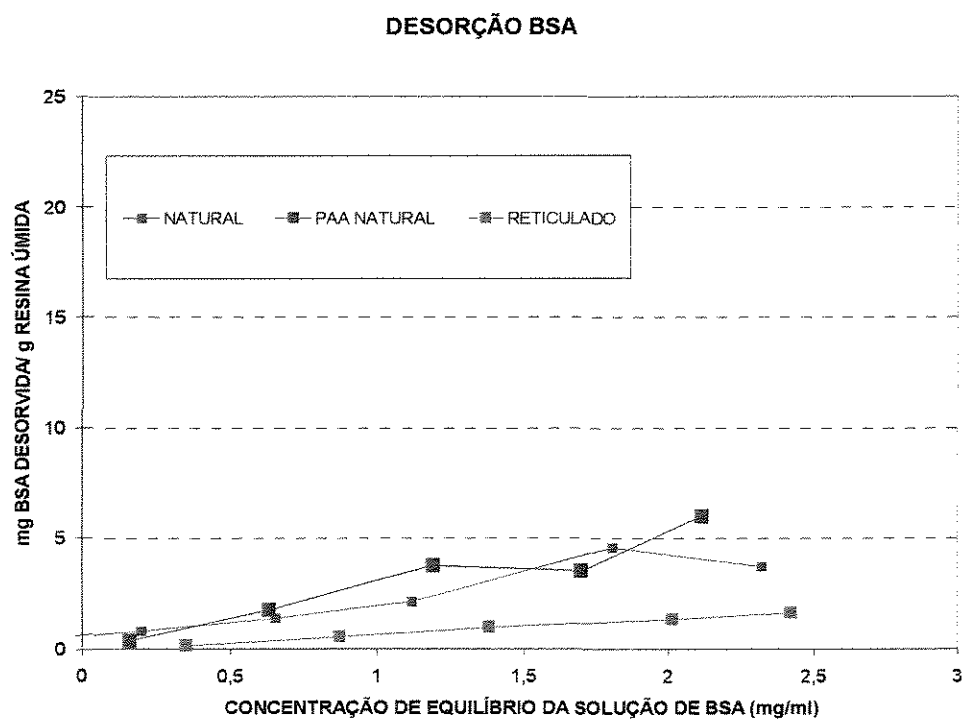
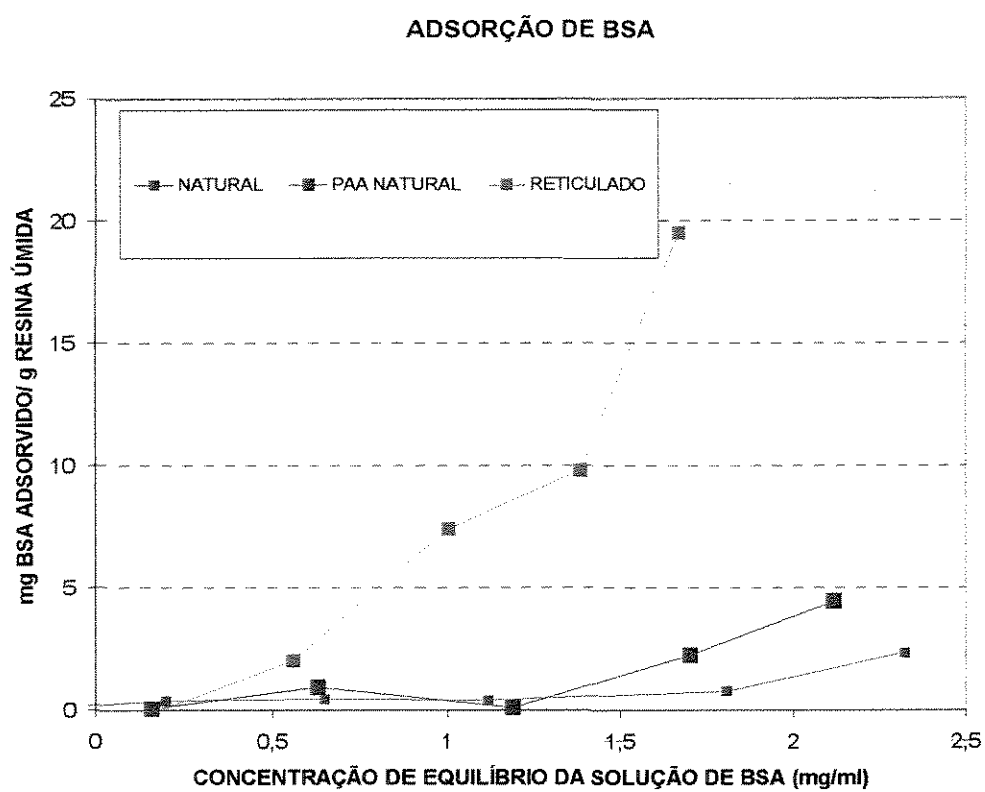
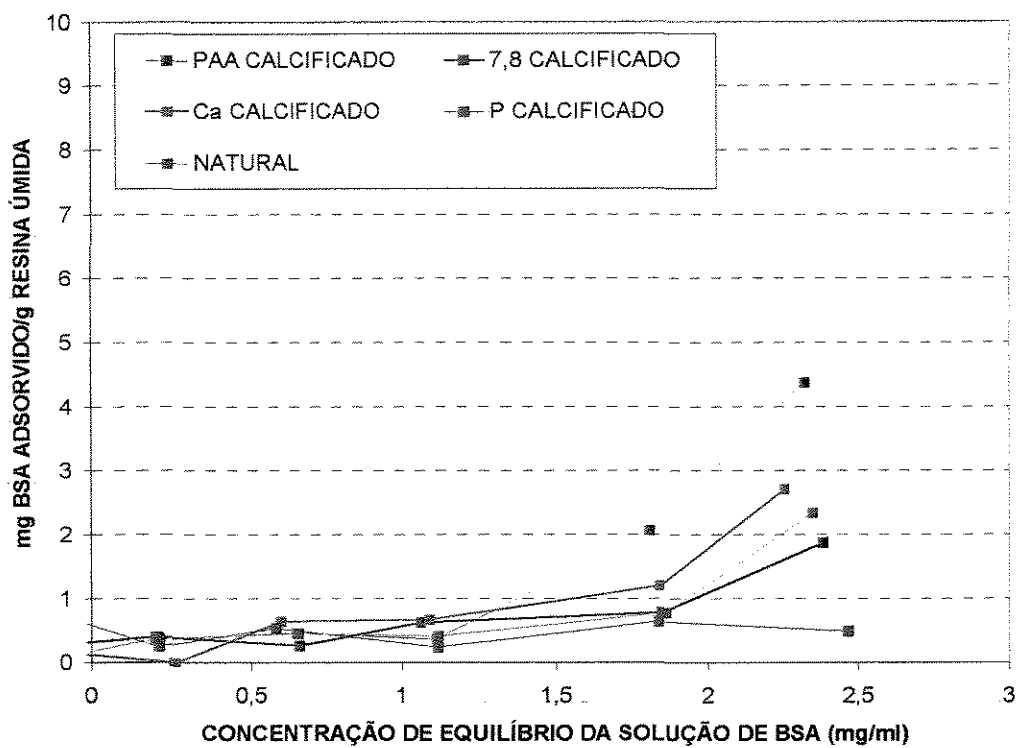


Figura 5.5.2-A: Isotermas de adsorção e curvas de desorção de BSA de quitosana não calcificada.

ADSORÇÃO DE BSA



DESORÇÃO BSA

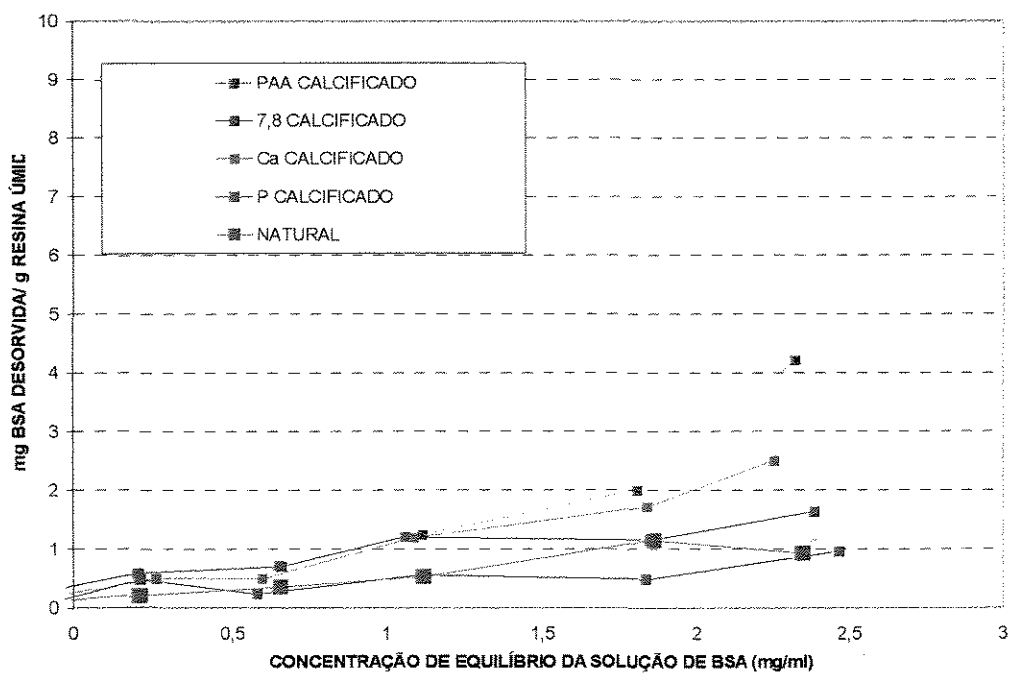


Figura 5.5.2-B: Isotermas de adsorção e curvas de desorção de BSA de quitosana calcificada.

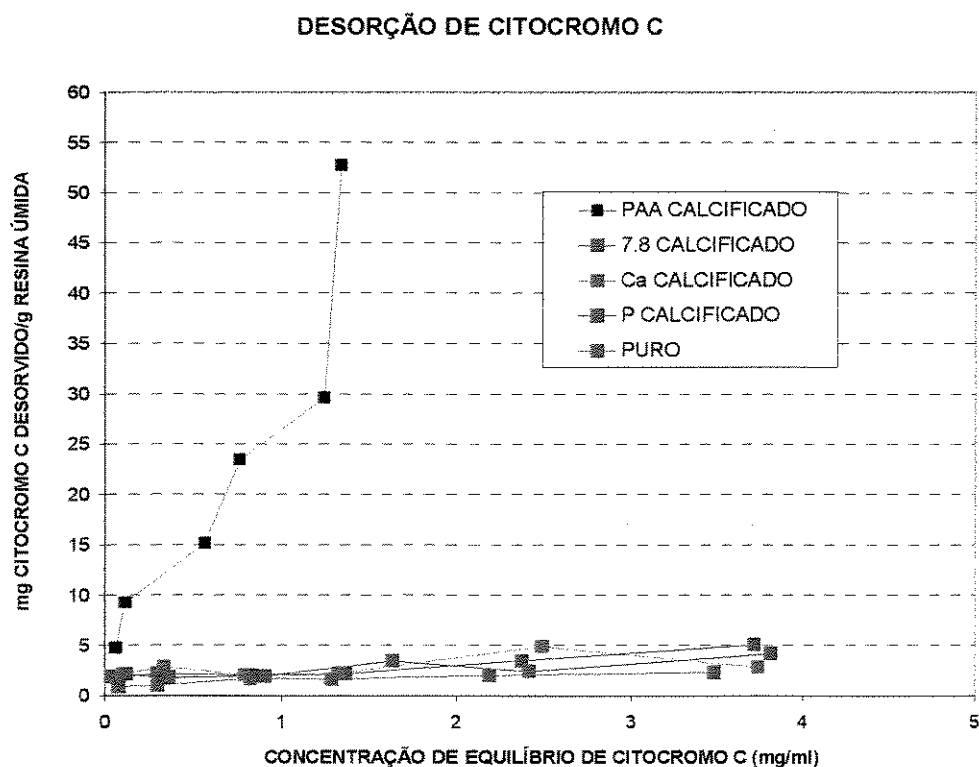
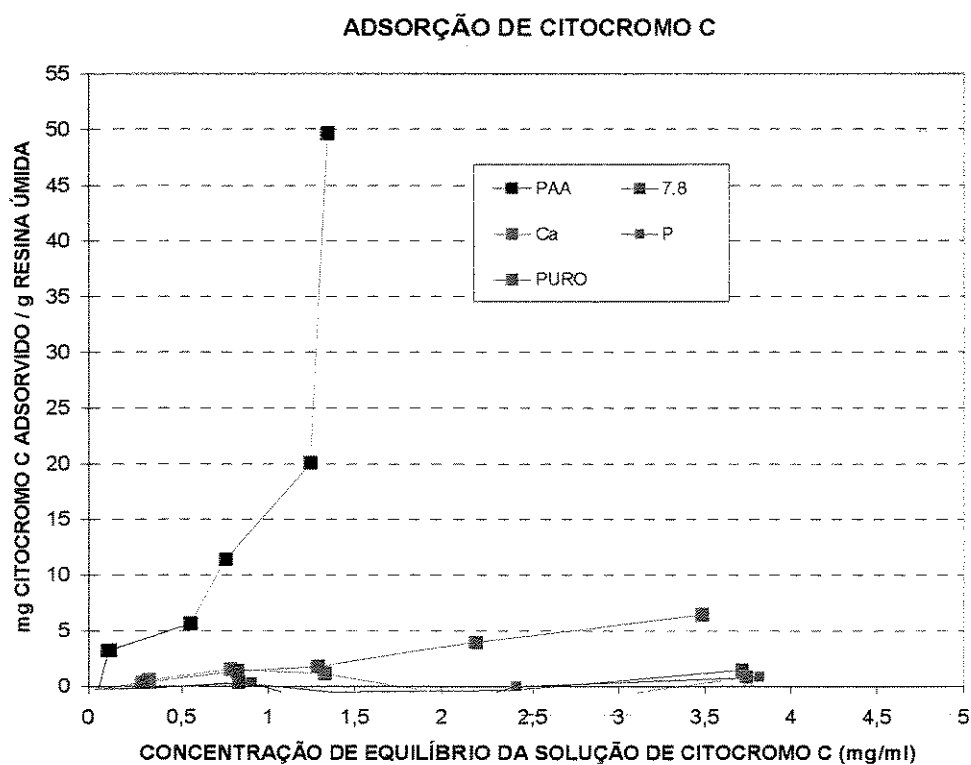


Figura 5.5.2-C: Isotermas de adsorção e curvas de desorção de citocromo C de quitosana calcificada.

5.5.2. Isoterma de Equilíbrio de Adsorção

A figura 5.5.2-A mostra os resultados dos ensaios de adsorção e desorção de BSA em quitosana natural, natural com PAA e reticulada com glutaraldeído (sem calcificação).

A quitosana reticulada com glutaraldeído mostra que adsorve muito bem BSA, porém nem toda a quantidade de BSA é desorvida com 1,0 molar de NaCl. Nota-se então, que a matriz reticulada, apresenta sítios capazes de interagir com a proteína BSA tanto com caráter eletrostático (hidrofílico), como com interações de caráter hidrofóbico. Por outro lado, em quitosana pura (com poucas cargas positivas a esse pH) e em quitosana com PAA, a mesma proteína adsorve-se bem menos e parece não haver muita interação hidrofóbica regendo o processo. Em outras palavras, a quitosana natural e com PAA apresentam adsorção de BSA com interações de caráter eletrostático, já que a desorção com NaCl foi praticamente total (a presença de sítios de carga pura justificaria este resultado).

A figura 5.5.2-B mostra que a amostra calcificada com excesso de íon fosfato absorve pouco BSA, o que concorda com o fato de que sítios negativos devem preponderar nesses depósitos. Essas isotermas mostram que BSA adsorve-se melhor:

Resinas calcificadas com PAA > com Ca > a 7.8 > com P

Se seu caráter ácido preferencialmente adsorve-se em sítios positivos, pode-se dizer que a quitosana calcificada com PAA e com excesso de Ca, mostram maior presença de sítios de troca aniônica do que para a quitosana calcificada com excesso de fosfato. A amostra calcificada com PAA e com concentração alta de íons cálcio adsorvem bem a proteína ácida, e a quase totalidade de desorção com adição de NaCl mostra que interações iônicas devem ser as principais responsáveis pela adsorção de BSA nessas amostras.

A resina calcificada com PAA adsorveu muito mais que todas as outras, o que se deve principalmente à carga dos depósitos de fosfato de cálcio ou daquelas introduzidas pelo PAA.

Por sua vez, as isotermas de citocromo C (figura 5.5.2-C) mostra que:

Resina calcificada com PAA > natural > calcificada nas demais condições

Poderia-se inferir que talvez as resinas calcificadas com PAA apresentassem muitos sítios negativos (troca catiônica), porém pode ser que a influência de grupos carboxílicos do PAA ainda estejam expostos em grande quantidade apresentando boa adsorção de citocromo C (preponderantemente positivo a pH 7,5). Já as demais quitosanas calcificadas, mostram pouca adsorção de citocromo C conforme os resultados

obtidos no item 5.5.1. Tal resultado nos leva a imaginar que a adsorção com PAA nos introduz sítios mais eficientes de adsorção de citocromo C do que propriamente a calcificação.

Se considerarmos a quantidade desorvida através da adição de NaCl como a quantidade proveniente de interação iônica, pode-se dizer que a calcificação "blindou" praticamente todos os sítios originais sem carga, utilizando-os para o início da deposição de fosfato de cálcio e a propagação. A carga superficial da matriz só influenciará as primeiras camadas de deposição de fosfato de cálcio. A partir de então, os depósitos é que interagirão (como parte da matriz), com as moléculas de proteína.

6. DISCUSSÃO FINAL

6.1. A obtenção das membranas de quitosana

Foi possível obter-se membranas de quitosana com porosidades razoavelmente bem controladas. Quanto maior a concentração do meio coagulante e quanto menor a concentração de quitosana na solução a ser coagulada, maior o tamanho dos poros formados. Esse fato pode ser bem compreendido ao lembrar-se que a coagulação de quitosana nada mais é que a "precipitação" desta devido à sua não-solubilidade em meio neutro ou básico. Para uma dada concentração de solução de quitosana, se a concentração de base a ser usada para a neutralização é alta, a desprotonação da quitosana acontecerá mais rapidamente, devido a dois motivos:

- 1) a migração de íons OH^- e H^+ acontece com maior velocidade devido à maior diferença de potencial químico entre as duas fases (solução de quitosana e solução neutralizante);
- 2) a cinética de neutralização é favorecida pela maior concentração de seus reagentes.

Se o processo é mais rápido, então uma maior quantidade de quitosana tenderá a coagular. Durante a coagulação, há uma tendência das moléculas de quitosana agregarem-se umas às outras, uma vez que têm maior afinidade entre si do que com as moléculas de água a $\text{pH} > 7$. Isto induz à aglomeração de quitosana em domínios maiores, abrindo também maiores espaços com solução aquosa (figura 6.1-A).

Seguindo-se o mesmo raciocínio, para uma mesma concentração de solução de base, se a densidade de moléculas de quitosana em solução é maior (solução mais concentrada), os poros formados serão menores, por dois fatores:

- 1) o processo de neutralização ocorrerá lentamente, reduzindo, para cada unidade de tempo, os domínios de quitosana a serem coagulados, onde haverá formação de poros menores;
- 2) espacialmente, a quitosana ocupa um volume maior na solução, pois encontra-se em maior concentração, deixando menos espaço aos poros a serem formados.

Os filmes, ou membranas densas, por sua vez, já não constituem soluções, mas sim, quitosana pura agregada por secagem, quando são submetidos à neutralização com solução de NaOH. Garante-se que não haja formação de macro-poros e que sua superfície seja muito plana, conforme verificado por MFA.

A caracterização por espectro de IV acusa a desprotonação das membranas após a coagulação. Os difratogramas de RX mostram a cristalinidade maior das membranas

densas. Este último fato deve-se ao poder de auto-organização da quitosana, associado ao fato de que a evaporação, sendo um processo mais lento que a coagulação com solução básica, permite uma melhor conformação das moléculas do polissacarídeo.

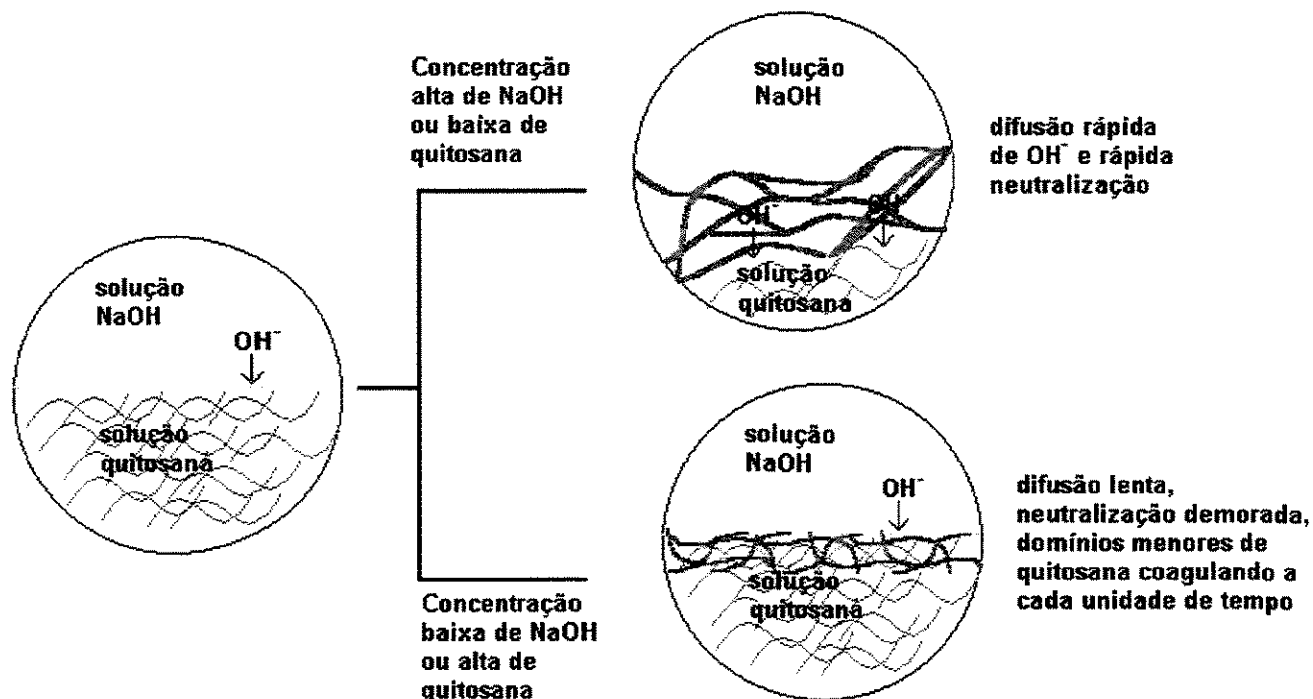


Figura 6.1-A: Modelo da coagulação e formação de membranas porosas de quitosana.

6.2. O tratamento das membranas de quitosana

O tratamento das membranas de quitosana com PAA dá-se, provavelmente, por efeitos eletrostáticos, ocorrendo em grande extensão em amostras naturais de quitosana.

A reticulação com glutaraldeído é muito discutida na literatura e acredita-se que esta torne a membrana mais hidrofóbica (o que não quer dizer que sua superfície não exponha alguns grupos carregáveis). Este fato é confirmado pelas medidas de absorção de água deste trabalho.

6.3. A influência dos fatores sobre a calcificação

Influência de reticulação com glutaraldeído

Recentemente, a pesquisa de substratos produzidos para estimular a biomineralização em sua superfície tem sido muito intensa. Isto se deve às contribuições que tais investigações podem adicionar ao entendimento dos processos de deposição nos corpos vivos. A maioria desses estudos prioriza os experimentos a baixos pH's (nos quais

precipitação espontânea não é observada na ausência da matriz orgânica). Esse fato ocorre, provavelmente, para evitar-se a dificuldade em distinguir-se os resultados decorrentes da influência da matriz e da precipitação espontânea no seio da solução. Entretanto, os resultados deste trabalho mostram que mesmo em situações onde precipitação espontânea é passível de ocorrer, há ainda uma significativa influência da matriz na deposição. Em nosso caso, tal influência é facilmente observada através da morfologia e composição dos depósitos. Formas esferoidais normalmente podem ser obtidas, uma vez que um núcleo de apatita se forma ancorado à matriz, crescendo através do consumo de íons cálcio e fosfato de maneira controlada, a partir do fluido em sua vizinhança.

No plasma, assim como nos fluidos corpóreos simulados, a razão Ca:P é 2,5. Os precipitados formados espontaneamente apresentam um valor de Ca:P normalmente maior que 2. Por outro lado, os depósitos formados nas membranas de quitosana mostram razões Ca:P próximas àsquelas encontradas em apatitas orgânicas (1,5-1,7 (Mucalo et alli, 1995)), principalmente nas membranas que não sofreram processos de reticulação. Este resultado indica que a quitosana natural apresenta grupos que influenciam fortemente a maneira como a precipitação dos compostos de cálcio acontece. Esse efeito é verificável mesmo a altos pH's (> 7,4), com a vantagem de que a calcificação é observável em tempos de indução menores que os observados em pH's mais baixos.

Como mostrado em vários estudos, o glutaraldeído possui muita afinidade para reagir com grupos amino (nos tecidos naturais, ele reage principalmente com grupos amino da lisina) (Golomb et alli, 1987). Esta propriedade, juntamente com os resultados mostrados através de espectroscopia de IV, denotam que o grupo amino é uma funcionalidade muito influente na precipitação de fosfato de cálcio. Uraki e colaboradores (1989) mostraram que a quitosana possui a capacidade de coordenar muitos cátions bivalentes. A quitosana poderia apresentar afinidade com grupos responsáveis pela calcificação, em sua forma neutra; ou ainda, atrair, eletrostaticamente, grupos fosfatos quando sob sua forma catiônica.

Em amostras reticuladas, o glutaraldeído é incorporado impedindo os grupos amino de influenciarem no processo de deposição, o que explicaria o fato das amostras tratadas com glutaraldeído mostrarem razões Ca:P próximos ao valor encontrado no precipitado. Além disso, o glutaraldeído transforma a quitosana numa estrutura mais apolar, devido à inserção de muitos grupos alquila. Isso gera também uma hidrofobicidade maior, fato este, confirmado pelos ensaios de absorção de água e ATG. Segundo a literatura, os tratamentos que induzem à formação de grupos mais polares (como as

hidrólises ácidas em polímeros como Nylon e polimetilmetacrilato) aumentam a capacidade de nucleação de apatitas (Tanahashi et alli, 1995). Assim, pode ser esperado, quimicamente, que a calcificação se reduza em quitosana reticulada.

Influência de tensão e defeitos de superfície e porosidade da membrana

Outros resultados relatados na literatura afirmam exatamente o oposto do observado neste trabalho: que os tecidos fixados com glutaraldeído são mais passíveis de sofrerem maiores níveis de calcificação (Koutsopoulos et alli, 1998). Um fato que explica essa diferença, é que as condições de calcificação *in vivo* ainda conta com outros fatores, tais como tensionamento dinâmico e mediação de células e proteínas. Normalmente, fragmentações de células, defeitos e tensões propiciam maior calcificação. Isso concorda com o fato da introdução de tensão mecânica e defeitos na superfície da quitosana ter permitido a calcificação localizada nessas regiões. Provavelmente a formação de grupos ativados pelos defeitos e tensões (princípios da mecanoquímica), capazes de interagir com íons da solução também justifique esse comportamento.

A porosidade é também um importante parâmetro na promoção de deposição no substrato. Isto foi confirmado por outros autores (Golomb, 1992) e concorda com a idéia de que quanto mais defeituosa e cheia de defeitos a superfície é, maior o teor de calcificação que esta superfície sofre. Três fatores podem contribuir para justificar essa teoria:

- 1) maiores difusividades mássicas de íons para o interior da matriz ajudariam a calcificação (confirmado pelos ensaios de difusão);
- 2) poros fornecem um maior ancoramento dos precipitados;
- 3) maior área de contato matriz-solução permite uma maior influência dos grupos químicos da matriz no processo de precipitação.

Nos sistemas *in vivo*, a formação e a acumulação de fragmentos de células e conseqüente exposição de proteínas específicas (tais como ao ácido γ -carboxiglutâmico ou ácido aminomalônico) é também considerada um fator adicional para o aumento da calcificação em vários materiais que possuem superfície irregular.

Há basicamente duas frentes que tentam explicar os fatores principais na biomineralização. Kokubo e colaboradores (1990) mostram que a calcificação depende da química da matriz onde ocorre a deposição.

Por outro lado, alguns autores, como Davies e seus colaboradores (1998) acreditam que a calcificação e os fenômenos de integração endo-óssea e osteocondução são primordialmente dependentes da micro-mecânica da superfície e não da natureza

química do biomaterial. A conexão óssea sempre foi referida como um fenômeno regido quimicamente, mas Davies acredita que materiais previamente considerados como não integráveis a ossos, podem sofrer osseo-integração, de maneira bioativa, através da criação de uma superfície apropriada. Dessa forma, o autor acha possível crescer ossos humanos *in vitro*, e mesmo sobre matrizes de polímeros biodegradáveis.

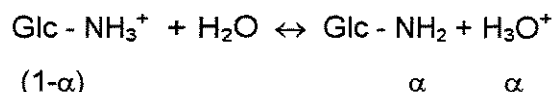
Em nosso caso, há evidências da ocorrência de ambos os fenômenos e, possivelmente, tanto a interação química e a interação física são efeitos complementares no processo de calcificação.

A composição dos depósitos é similar às apatitas orgânicas encontradas na natureza. Alguns deles mostram picos de IV evidenciando apatitas carbonatadas (1700 e 1400 cm^{-1}), considerados materiais biologicamente mais compatíveis.

Nota-se que o controle tanto químico quanto físico do substrato de quitosana influencia na deposição de fases minerais, tanto quanto o controle da composição e pH da solução calcificante.

Influência do pH da solução calcificante

O pH é um fator muito importante na deposição. Um importante parâmetro a ser levado em conta nessa interpretação é o pKa. A protonação dos grupos amino da quitosana pode ser representado por:



$$\text{pKa} = \text{pH} + \log (1-\alpha)/\alpha \quad (\text{Katchalsky's})$$

onde α é a fração de NH_2 .

como o pKa da quitosana está entre 6,3 a 7, temos:

Tabela 6.3-A: Tabela que mostra a fração de grupos amino não carregados a cada pH.

pKa = 6,3	0,8882	0,9264	0,9693
pKa = 7,0	0,6131	0,7153	0,8632

Como observa-se na tabela acima, a pH 7,8, a quitosana apresenta a maior parte dos grupos amino na forma desprotonada. Assim, só há a possibilidade de haver a coordenação de cátions através do par eletrônico disponível no nitrogênio.

Altos pH's promoveram calcificações mais rápidas, enquanto que a baixos pHs, não foi observada calcificação mesmo após um mês. Nesse estado, há uma grande quantidade de grupos amino protonados.

Formação dos precipitados a $[P]$ e $[Ca]$ alto

A formação de depósitos nas condições de $[P]$ e $[Ca]$ são claramente diferentes e, devido à diferença de morfologia (interconectividade com a matriz), é muito provável que o mecanismo de separação de fases em um e outro caso, sejam diferentes.

Sabe-se que a separação de fases segue dois mecanismos básicos:

1) Nucleação e Crescimento (NG): A separação se inicia com o aparecimento de núcleos instáveis de uma fase dispersa já com a composição de equilíbrio. A separação evolui com aumento do diâmetro dos núcleos, sem que sua composição seja alterada (figura 6.3-A). Somente a composição da matriz ou meio em que os núcleos estão dispersos varia. A morfologia observada durante todo o processo é do tipo matriz/domínio dispersos com larga faixa de distribuirão de tamanhos, com pouca conectividade entre os núcleos (Utracki et alli, 1989).

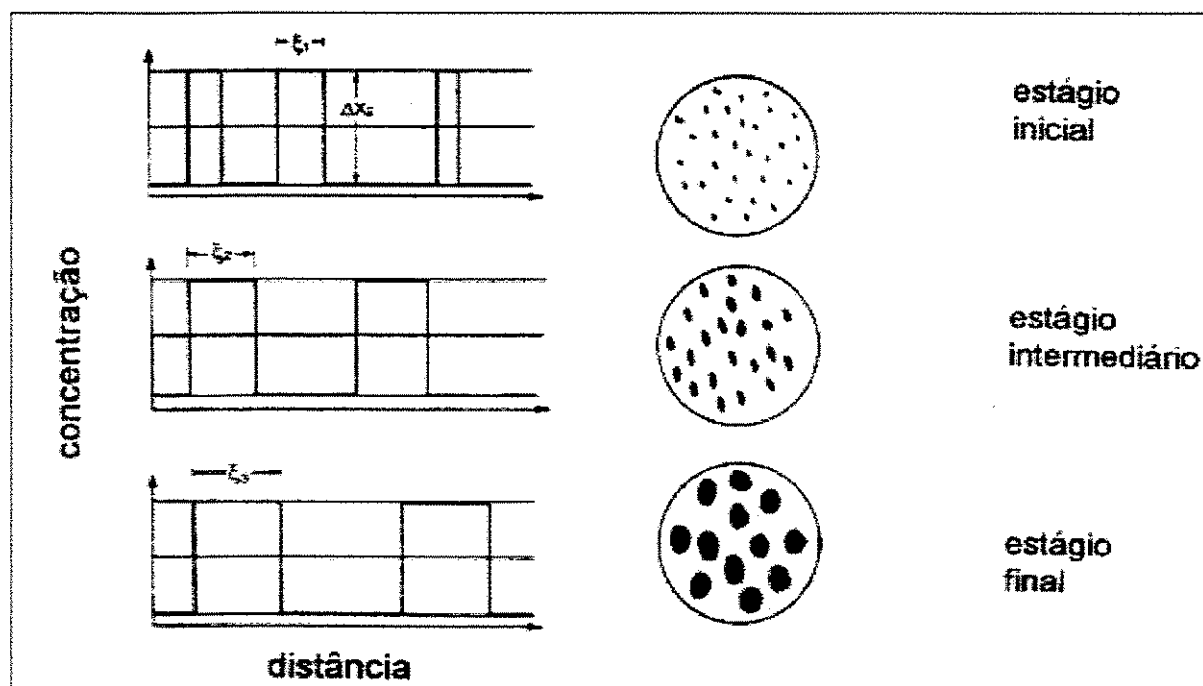


Figura 6.3-A: Representação esquemática dos estados inicial, intermediário e final de separação de fases pelo mecanismo de nucleação e crescimento (NG).

2) Decomposição "Spinodal" (SD): Ela se inicia por flutuações de concentração. Se a concentração pudesse ser medida em diferentes regiões do sistema, seria possível obter

os gráficos descrevendo variações "senoidais" da concentração em função da posição ao longo de uma linha imaginária, que corta o sistema. A amplitude desta onda senoidal representa a variação da concentração naquela posição em relação à concentração inicial do sistema. Seu valor vai aumentando até, o equilíbrio termodinâmico, em que se possa distinguir duas fases contínuas cujas interfaces são inicialmente difusas. Na separação de fases SD, podem ser identificados três estágios distintos. Nos primeiros estágios, ocorrem flutuações de concentração em todo sistema e o comprimento de onda das flutuações é praticamente constante, porém, suas amplitudes aumentam com o tempo. Nos estágios intermediários, tanto as amplitudes quanto o comprimento de onda das flutuações aumentam. Nos últimos estágios, a amplitude e o comprimento de onda são máximos, caracterizando a coalescência das fases, que leva a uma morfologia do tipo matriz/domínio. É esperada uma conectividade entre os domínios maior que numa separação de fases NG (figura 6.3-B).

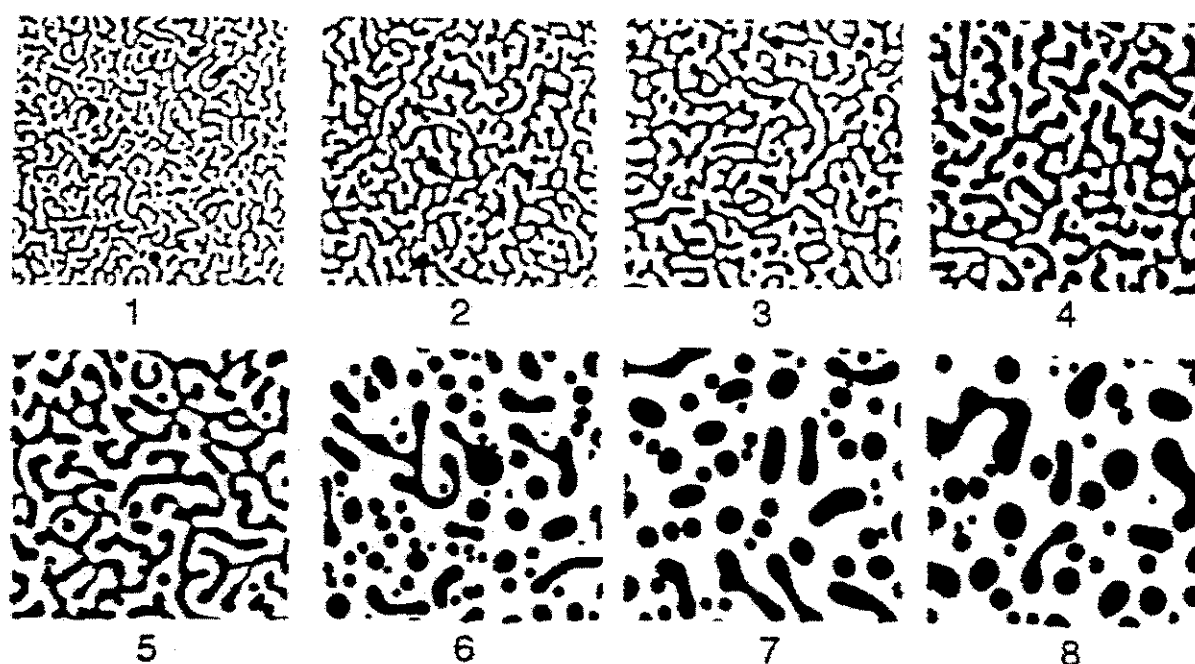


Figura 6.3-B:- Desenvolvimento da morfologia em blendas poliméricas que separam fases por decomposição "spinodal", onde os estágios iniciais correspondem a 1-2, intermediários a 3-5 e finais a 6-8.

É muito provável que, ao utilizarmos concentrações altas de $[P]$, estejamos entrando numa região propícia à separação do tipo spinodal. Os precipitados obtidos sob essa condição têm uma área e uma morfologia que mostra que houve uma grande interconectividade com a fase líquida nas proximidades da quitosana. Já as demais condições, com $[Ca]$ alto ou a pH 7,8 em FCS normal, mostram precipitados com uma

morfologia muito mais próxima ao obtido por um mecanismo de nucleação e crescimento. A morfologia, apesar de não ser determinante na definição do tipo de separação de fases ocorrido, pode evidenciar que os mecanismos que regem a deposição em uma ou outra condição são diferentes.

Os resultados de RX também revelam a diferença desses mecanismos.

Kokubo (Li et alli, 1993) afirma que o controle da apatita formada sobre sílica é relacionado com a razão Ca/P no fluido. Ele afirma ser muito provável que a razão Ca/P varie, especialmente na fronteira da apatita com o fluido. Numa fronteira onde há pouco Ca disponível ($\text{Ca/P} < 1,5$), o autor encontrou uma geometria mais granulada, enquanto que onde havia muito Ca, observou uma morfologia mais floculada nos seus precipitados. Tais morfologias não estão de acordo com os encontrados neste trabalho, mas nota-se que a relação Ca/P é um forte influenciador, pois pode determinar a maneira como se dará a separação de fases, e, logo, determinará a morfologia e a composição das fases precipitadas.

Influência da adição de PAA na superfície de quitosana

A incorporação de PAA na superfície da quitosana mostrou uma maior cobertura da quitosana pela fase mineral. Segundo Forsén e Kördel, há várias peculiaridades nas ligações efetuadas com o cátion cálcio. É comum compará-lo ao Mg (que também é muito encontrado em fluidos biológicos) e com Cd. Sob o número de coordenação 6, o raio iônico do Ca^{2+} , Cd^{2+} e Mg^{2+} são respectivamente, 1,00, 0,95 e 0,72 ângstrons, e sob o número de coordenação 8, temos 1,12, 1,10 e 0,89 ângstrons, respectivamente.

Ca^{2+} prefere fortemente ligantes de oxigênio do que nitrogênio ou enxofre; ligações $\text{Ca}^{2+}\text{---N}$ são cerca de 0,25 a 0,3 ângstrons mais longos que as ligações $\text{Ca}^{2+}\text{---O}$. grandes diferenças no número de coordenação e geometria são observados nos complexos de cálcio. Em um estudo envolvendo 170 estruturas de complexos de cálcio e grupos carboxilatos, foi mostrado que a ligação poderia ser do tipo unidentado, onde que os cátions cálcio interagiriam com somente um dos dois oxigênios do grupo carboxilato (com uma distância $\text{Ca}^{2+}\text{---O}$ de 2,38 angstrons); bidentado, onde o cátion cálcio estaria quelado pelos dois oxigênios carboxilatos (com uma distância $\text{Ca}^{2+}\text{---O}$ de 2,53 ângstrons); ou misturado (modo- α), onde o cálcio é quelado por um dos oxigênios e um dos carbonos- α . Em contraste, Mg^{2+} quase sempre ocupa o centro de um octaedro de átomos de oxigênio (número de coordenação 6) com uma distância fixa $\text{Mg}^{2+}\text{---O}$ de $2,05 \pm 0,05$ ângstrons de distância. Outra diferença entre os cátions magnésio e cálcio, é que normalmente, este último mostra-se normalmente mais estável a vários ligantes. A

seletividade de Ca^{2+} em relação a Mg^{2+} não é muito grande para ligantes carboxilados simples, porém, ela tende a se pronunciar para os ligantes multidentados (como proteínas e polieletrólitos).

Outra diferença entre as propriedades dos ligantes Mg^{2+} e Ca^{2+} pode ser vista, comparando-se as taxas de substituição de moléculas de água na esfera de hidratação por ligantes simples:



A taxa ($\log k$, com k em s^{-1}) foi obtida como 8,4 para Ca^{2+} e 5,2 para Mg^{2+} .

Isso explicaria essa maior estabilidade das ligações com cálcio.

A interação do cálcio com o PAA, daria-se então, pelos oxigênios carboxilatos também. O mecanismo se pode propor é mostrado na figura 6.3-C e D.

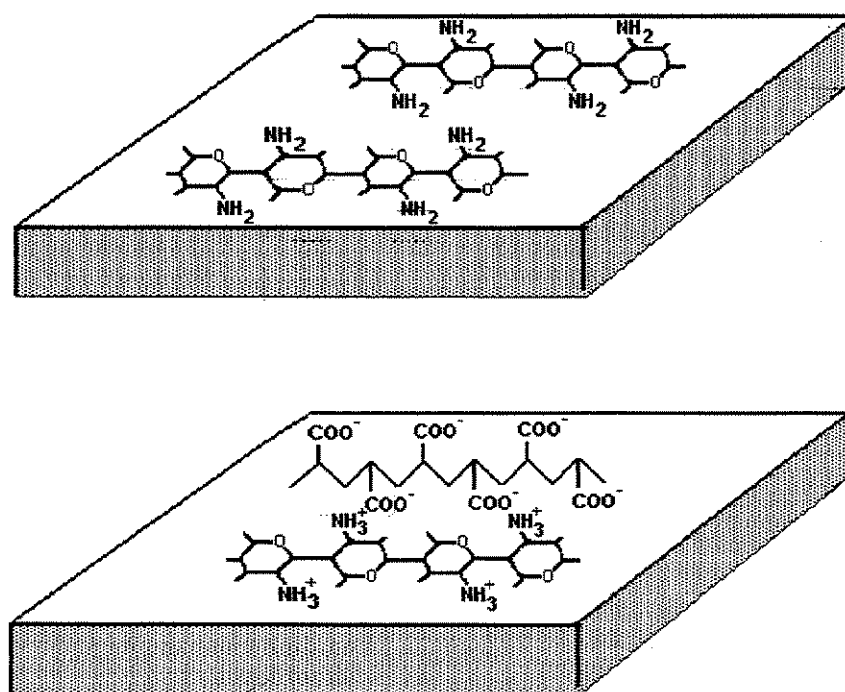


Figura 6.3-C: Modelo da adsorção de PAA na membrana de quitosana.

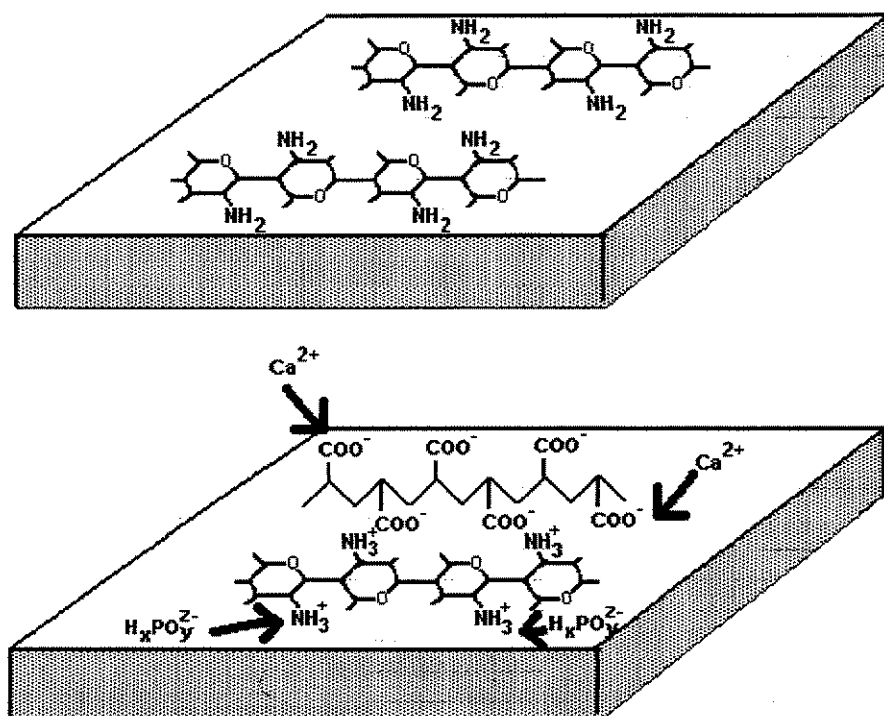


Figura 6.3-D: Modelo do processo de calcificação ocorrida com as membranas de quitosana após adsorção com PAA.

Os íons fosfato teriam ainda uma possibilidade de ligarem-se pelos grupos amino e os cátions cálcio, de se ligarem às carboxilas. A diferença da deposição sobre amostras tratadas com PAA e com amostras sem tratamento, mostram que a calcificação ainda pode ser bastante regido pelos fenômenos químicos de interação na calcificação.

6.4. Modelo da calcificação sobre a quitosana

Podemos finalmente, propor um mecanismo da calcificação de quitosana:

- A porosidade e a permeabilidade influem positivamente no grau de calcificação obtido sobre o substrato;
- Há um processo de nucleação sobre a quitosana que parece obedecer principalmente afinidade eletrostática;
- A composição do meio calcificante influi no tipo de mecanismo de geração de depósitos (NG ou separação de fases), e no seu grau de cristalinidade.

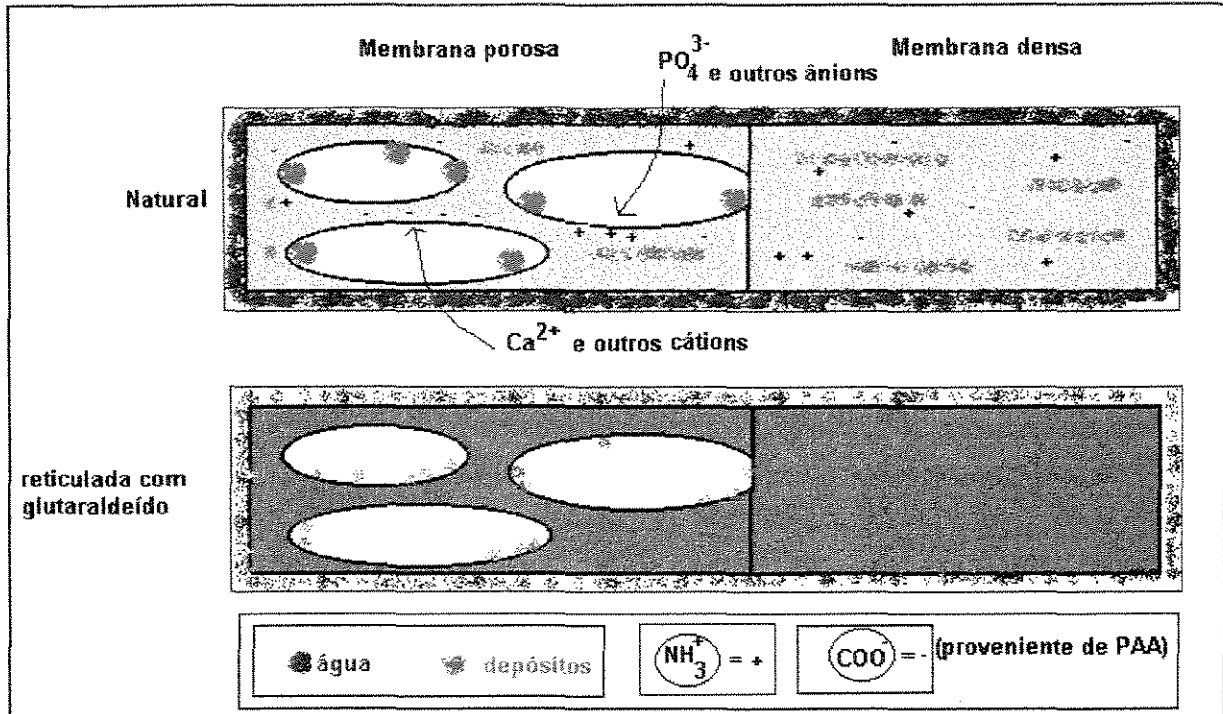


Figura 6.4-1: resumo das principais influências no processo de calcificação de quitosana.

7. CONCLUSÃO

Deste trabalho conclui-se que:

- podemos obter membranas densas e porosas de quitosana controlando-se as condições de coagulação: concentração da solução de quitosana e da solução coagulante (NaOH);
- pode-se reticular a quitosana, bloqueando-se os grupos amino através do contato da membrana com uma solução diluída de glutaraldeído. Controlando-se o tempo e a concentração da solução, assim como a temperatura, e diversos graus de reticulação são obtidos. Esse tratamento muda as características mecânicas da membrana, que se torna mais quebradiça, e também torna a membrana mais hidrofóbica, fato esse verificado pela diminuição da absorção de água e também pelos resultados de ATG. MFA mostra que a superfície da membrana densa continua bastante plana, porém, mais sensível e frágil. A permeação de íons nas membranas também é dificultada, quando há reticulação da quitosana;
- foi possível realizar a adsorção de PAA na superfície de membranas de quitosana de maneira controlada. As análises de titulação potenciométrica confirmam a idéia de que o PAA adsorve-se nos sítios de grupo amino, através de seus grupos carboxílicos;
- os experimentos de calcificação em quitosana mostraram grande influência das características físicas (da porosidade de suas membranas e irregularidades de superfície) e químicas (composição da superfície) no grau de mineralização obtido. A reticulação com glutaraldeído ou o tratamento com PAA mostram que as interações químicas são muito importantes na deposição, assim como a composição e o pH do meio coagulante.

8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar as condições de calcificação sobre a quitosana, que podem variar de acordo com o objetivo (ex.: obtenção de depósitos cristalinos, obtenção de maior quantidade de depósito, etc);
- Verificar a resposta *in vivo* da quitosana calcificada;
- Explorar outras aplicações da quitosana calcificada (ex. resinas cromatográficas).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamson, A.W. *Physical Chemistry of Surfaces*. 5ª edição, Nova Iorque: John-Wiley & Sons, p.421-453, 1990;
- Agarwal, R. e Gupta, M.N. *Evaluation of glutaraldehyde-modified chitosan as a matrix for hydrophobic interaction chromatography*. *Analytica Chimica Acta*, 1995; 313: 253-257;
- Arruda, E.J. Tese de Doutorado, FEQ - Unicamp, 1999;
- Barros Neto, B.B., Scarminio, I.S. e Bruns, R.E. *Planejamento e Otimização de experimentos*. Campinas: 1995, Editora da Unicamp, Cap 5.8, 165-176;
- Billmeyer, F.W. *Textbook of Polymer Science*, John Wiley & Sons, Cingapura, 1984;
- Calvert, P. e Rieke, P. *Biomimetic mineralization in and on polymers*. *Chem. Mater.*, 1996, 8: 1715-1727;
- Codaro, E.N. e Guastaldi, A.C. *Uma introdução aos biomateriais*. Informativo CFQ, p.5, setembro, 1998;
- Conway, B.E. *Ionic hydration in chemistry and biophysics*. Holanda: Elsevier Scientific Publishing Company, p.73, 1981;
- Davies, J.E. *Mechanisms of endosseous integration*. Palestra apresentada no 1º COLAOB, 1998. Belo-Horizonte, Brasil;
- Dee, F.S. e Ettre, L.S. *Encyclopedia of Industrial Chemical analysis*. Nova Iorque: Interscience Publisher, Vol 17, p. 82-84, 1973;
- Eillet, R.; Gull, K. *Glutaraldehyde-its purity and stability*. *Histochemie*, 1972, 3: 162-167;
- Elliott, J.C. *Structure and Chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*. Holanda: Elsevier Science, 1994;
- Freeman, W.J. *Characterization of Polymers*, In: *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. Vol.3. Jacqueline I. Kroschwitz (Ed.) John Wiley & Sons, Nova Iorque: 1985;

- Forsén, S. e Kördel, J. *Calcium in biological systems*, John Wiley & Sons, Nova Iorque: 1997;
- Furlan, L., Fávere, V.T., Laranjeira, M.C.M. *Adsorption of calcium ions by graft copolymer of acrylic acid on biopolymer chitin*. Polymer, 1996, 37: 843-846;
- Gaillard, M.L., e Van Blitterswijk, C. A. *Pre-operative addition of calcium ions or calcium phosphate crystals to PEO/PBT copolymers (Polyactive™) stimulates bone mineralization in vitro*. J. Mater. Sci. Mater. Medicine, 1994, 5: 695-701;
- Golomb G, Dchoen FJ, Smith MS, Linden J, Dixon M, Levy RJ. *The role of glutaraldehyde-induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses*. Am. J. Pathol., 1987, 127: 122-130;
- Golomb, G. e Wagner, D..*Development of a new in vitro model for studying implantable polyurethane calcification*. Biomaterials, 1991, 12: 397;
- Golomb G. *Calcification of polyurethane-based biomaterials implanted subcutaneously in rats: role of porosity and fluid absorption in the mechanism of mineralization*. J. Mater. Sci. Mater. Medicine, 1992, 3: 272-377;
- Hasegawa, M., Isogai, A e Onabe, F. *Preparation of low-molecular-weight chitosan using phosphoric acid*, Carbohydrate Polymers, 1993, 20: 279-283;
- Hofmeister, F. *Zur lehre von der wirkung der salze*. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., 1888, 24: 247;
- Joint Committee on Powder Diffraction standards, JCPDS 9-432, Swathmore, PA, 1988 apud Ishikawa,K.; Ducheyne,P. e Radin, S. *Determination of the Ca:P ratio in calcium-deficient hydroxyapatite using X-ray diffraction analysis*. J. Mater. Sci. Mater. Medicine, 1993, 3: 165-168;
- Kawasaki, T. *Hydroxyapatite as a liquid chromatographic packing*, J. Chromatography, 1991, 544: 147-184;
- Kepner, B.L. e Hercules, D.M. *Fluorometric determination of calcium in blood serum*. Analytical Chemistry, 1963, 35 (9): 1238-1240;
- Kienzle-Sterser, C.; Rodriguez-Sanchez, D.; Rha, C. *Rheology*, 1980, 3: 621;

- Kimura, I., Pozza, F., Felix, E.G., Stolberg, J. e Fávere, V.T. *Adsorção Corante Remazol Brilliant Orange 3R (Reativo Laranja 16) por microesferas de quitosana reticuladas*. Resumo de Congresso - Comunicação pessoal, 1999;
- Koenig, J.L e Kormos, D. *Quantitative infrared spectroscopic measurements of mixtures without external calibration*. Appl. Spectroscopy, 1979, 33: 349-350;
- Kokubo, T., Ito, S., Huang, Z.T., Hayashi, T., Sakka, S., Kitsugi, T. e Yamamuro, T. *Ca,P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W*. J. of Biomed. Mater. Res., 1990, 24: 331-343;
- Koutsopoulos, S., Kontogeorgergou, A., Ptroheilios, J. e Dalas, E. *Calcification of porcine and human cardiac valves: testing of various inhibitors for antiminerallization*. J. Mater. Sci. Mater. Medicine, 1998, 9: 421-424;
- Lerner, E, Sarig, S e Azouri, R. *Enhanced maturation of hydroxyapatite from aqueous solutions using microwave irradiation*, J. Mater. Sci. Mater. Medicine, 1991, 2: 138-141;
- Li, P., Nakanishi, K., Kokubo, T. e de Groot, K. *Induction and morphology of hydroxyapatite, precipitated from metastable simulated body fluids on sol-gel prepared silica*. Biomaterials, 1993, 14 (13): 963-968;
- Li, P., Kokubo, T., Nakanishi, K., Soga, N., Nalkamura, T. e Yamamuro, T. *Process of formation of bone-like apatite layer on silica-gel*. J. Mater. Sci. Mater. Medicine, 1993; 4: 127-131;
- Li, S.H., Liu, Q. de Wijn, J., Zhou, B.L. e de Groot, K. *Calcium phosphate formation induced on silica in bamboo*. J. Mater. Sci. Mater. Medicine, 1997, 8: 427-433;
- Lide, D.R. e Kehiaian, H. V. *CRC Handbook of thermophysical and thermochemical data*. Flórida: CRC Press, p. 427, 1994;
- Martin, R.I. e Brown, P.W. *Formation of hydroxyapatite in serum*. J. Mater. Sci. Mater. Medicine, 1994, 5: 96-102;
- Monma, H, Ueno, S, Tsutsumi, M e Kanazawa, T. *Yogyo Kagaku Shi*, 1978, 86: 28;
- Monteiro, O.A.C e Airoidi, C. *Some studies of cross-linking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system*. Int. J. Biological Macromol., no prelo;

- Mossan, P, Puzo, G. e Mazarguil, H. *Étude du mécanisme d'établissement des liaisons glutaraldéhyde-protéines*. Biochimie, 1975; 57: 1281-1291;
- Mucalo, M.R., Toriyama, M., Yokogawa, Y., Suzuki, T., Kawamoto, Y., Nagata, F. e Nishizawa, K. *Growth of calcium phosphate on ion-exchange resins pre-saturated with calcium or hydrogenphosphate ions: an SEM/EDX and XPS study*. J. Mater. Sci. Mater. Medicine, 1995, 6: 409-419;
- Muzzareli, R.A, Mattioli-Belmonte, M., Tietz, C., Biagini, R., Ferioli, G., Brunelli, M.A., Fini, M., Giardino, R., Ilari, P., Biagini, G. *Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan*. Biomaterials, 1994, 16: 1075-1081;
- Nakamoto, K. *Infrared and Raman spectra of Inorganic and Coordination Compounds*. New York: John Wiley and Sons, pp.173, 1978;
- Nordström, E.G. And Karlsson, K.H. *Carbonate-doped hydroxyapatite*. J. Mater. Sci. Mater. Medicine, 1990, 1(3): 182-184;
- Northop J. N. e Anson, M.L., J. Gen Physiol., 1928, 12: 543;
- Nyquist, R. A. e Kagel, R.O. *Infrared Spectra of Inorganic Compounds*. New York: Academic Press, p.163, 1971;
- Ogawa, K. Hirano, S, Miyanishi, T., Yui, T e Watanabe, T.. *A new polymorph of chitosan*, Macromolecules, 1984, 17: 973-5;
- Pathak, Y, Schoen, F.J. e Levy, R.J. *Pathologic calcification of biomaterials*. In: Ratner, B.D. e Hoffman, A.S., Schoen, F.J. e Lemons J.E., eds. Biomaterials science - an introduction to materials in medicine. California: Academic Press, 1996: 272-81;
- Petro, M.; Svec, F.; Frechet, J.M.J. *Immobilization of trypsin onto "molded" macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate rods and use of conjugates as bioreactors and for affinity chromatography*. Biotechnology and Bioengineering, 1996, 49: 355-363;
- Pogodina, N.V., Pavlov, G.M., Bushin, S.V., Melnikov, A.B., Lysenko, Ye.B., Nudga, L.A., Marshева, V.N., marchenko, G.N. e Tsvetkov, V.N. *Conformational characteristics of chitosan molecules as demonstrated by diffusion-sedimentation analysis and viscometry*. Polymer Science U.S.S.R., 1986, 28(2): 251-259;

- Radin, S. e Ducheyne, P. *Effect of serum proteins on solution-induced surface transformations of bioactive ceramics*. J. Biom. Mater. Res., 1996, 30: 273-279;
- Raymond, L., Morin, F.G. e Marchessault, R.H. *Degree of deacetylation of chitosan using conductimetric titration and solid-state NMR*. Carbohydrate Res., 1993, 246: 331-336;
- Ren, J. e Jiang, C. *Transport Phenomena of chitosan membrane in pervaporation of water-ethanol mixture*, Separation Sci. And Technol. , 1998, 33(4), 517-535;
- Rodriguez-Sanchez, D. e Rha, C. *Chitosan Globules*, J. Fd Technol., 1981, 16: 469-479;
- Ruijgrok, J.M.; Wijn, J.R. e Boon, M.E. *Optimizing gluteraldehyde crosslinking of collagen: effects of time, temperature and concentration as measured by shrinkage temperature*. J. Mater. Sci.: Mater. in medicine, 1994, 5(2): 80-87;
- Saito, H, Tabeta, r. e Ogawa, K. *High-resolution solid state ^{13}C NMR study of chitosan and its salts with acids*, Macromolecules, 1987, 20: 2424-30;
- Sakurai, K. *Ultrafiltration chitosan membranes* in Chitin Handbook (Ed. Muzzarelli, R.A.A. e Peter. M.G.), Via San Martino, Italy: Atec Edizioni, p. 445-450, 1997;
- Sandford, P.A. *Chitosan: commercial uses and potential applications*. In: Skjaek-Braek, G, Anthonsen, T, Sandford, P, eds. Chitin and chitosan., Essex: Elsevier Applied Science, p. 51-69, 1989;
- Shih, Y.C.; Prausnitz, J.M. e Blanch, H.W. *Some characteristics of protein precipitation by salts*. Biotechnology and Bioengineering, 1992, 40: 1155-1164;
- Simionescu, A.; Simionescu, D. e Deac, R. *Lysine-enhanced gluteraldehyde crosslinking of collagenous biomaterials*. J. Biomed. Mater. Res., 1991, 25: 1495-1505;
- Stupp, S.I. et alli. *Journal Mater. Res.*, 7, 2599 (1992), J. Biomed. Mater. Res., 1992, 26: 169-183;
- Stupp, S.I. et alli. *J. Biomed Mater Res*, 27, 289-199 (1993), J. Biomed. Mater. Res., 1993, 27: 301-311;

- Tanahashi, M., Yao, T., Kokubo, T., Minoda, M., Miyamoto, T., Nakamura, T. e Yamamuro, T. *Apatite coated inorganic polymers by biomimetic process: improvement in adhesion to substrate by HCl treatment*, J. Mater. Sci. Mater. Medicine, 1995, 6: 319-326;
- Uragami, T. *Chitosan derivative membranes for separation of alcohol/water mixtures* In Chitin and Chitosan (Ed. Muzzarelli, R.A.A. e Peter. M.G.), Via San Martino, Italy: Atec Edizioni, p. 783, 1997;
- Uragami, T. *Preparation and characteristics of chitosan membranes* in Chitin Handbook (Ed. Muzzarelli, R.A.A. e Peter. M.G.), Via San Martino, Italy: Atec Edizioni, p. 451-455, 1997;
- Uraki Y., Nishi H., Nishimura S, Tokura S. *Adsorption properties of calcium-carboxymethylated chitin complex*. In: Skjaek-Braek G, Anthonsen T, Sandford P, eds. Chitin and chitosan., Essex: Elsevier Applied Science, p. 537-540, 1989;
- Utracki, L.A. *polymer alloys and blends - thermodynamics and rheology*. Munich: Hansen Publishers, p. 29-52, 1989;
- V. Hattingberg, H.M., Kalus, W., Lüllmann, H. e Zepf, S. *Fluorometrische bestimmung von mikromengen calcium in muskelgewebe*. Specialia, 1966, 15 (VIII): 553-555;
- Wang, H., Li, W., Lu, Y., e Wang, Z. *Studies on Chitosan and Poly(acrylic acid) Interpolymer Complex. I. Preparation, Structure, pH-sensitivity, and Salt Sensitivity of Complex Forming Poly(acrylic acid): Chitosan Semi-Interpenetrating Polymer Network*. J. Appl. Polym. Sci., 1997, 65: 1445-1450;
- Willians, D.F. *Definitions in Biomaterials*, Proceedings of a Consensus Conference of the European Society of Biomaterials, 1986 (Edited in 1987);
Yamauchi, M.; Mechanic, G. *Crosslinking of collagen*. In: Collagen, Nimmi, M.E. (ed), Boca Raton, Florida: CRC Inc., p.157-172, 1988;
- Yoshioka, S.A.; Oliveira, J.; Sartori, L.; Goissis, G. *Estudo da reticulação do pericárdio bovino com glutaraldeído em função da concentração e temperatura*. Anais do 3º Congresso Brasileiro de Polímeros. Associação Brasileira de Polímeros. Rio de Janeiro, 1995, 1: 265-268;

- Zhang, S. e Gonsalves, K. E. *Synthesis of calcium carbonate-chitosan composites via biomimetic processing*. J. Appl. Polym. Sci., 1995, 56: 687-695;
- Zhang, S. e Gonsalves, K.E. *Preparation and Characterization of thermally stable nanohydroxyapatite*. J. Mater. Sci. Mater. Medicine, 1997, 25-28.